

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра генетики и биотехнологии

Слепченков Александр Васильевич

Разработка платформы для экспонирования гетерологичных белков на поверхности
клеток дрожжей

Выпускная квалификационная работа магистра

(магистерская диссертация)

Работа выполнена в лаборатории
биохимической генетики СПбГУ.
(зав. лаб - д.б.н., профессор кафедры
генетики и биотехнологии СПбГУ,
Падкина Марина Владимировна)

Научный руководитель:
профессор кафедры генетики и
биотехнологии СПбГУ, д.б.н.,
Самбук Елена Викторовна

Куратор:
м.н.с. кафедры генетики и
биотехнологии СПбГУ, к.б.н.,
Румянцев Андрей Михайлович

Санкт-Петербург
2018

Оглавление

Список сокращений	3
Введение	4
Дрожжевой дисплей - передовое направление современной биотехнологии (обзор литературы)	6
История развития технологий иммобилизации белков	6
Области применения дрожжевого дисплея.....	8
Состав и структура клеточной стенки дрожжей	15
Якорные белки <i>S. cerevisiae</i> , используемые для дрожжевого дисплея	16
Другие виды дрожжей, используемые в дрожжевом дисплее	24
Дрожжи <i>P. pastoris</i> и их применение в дрожжевом дисплее	25
Кислая фосфатаза Pho5p <i>S. cerevisiae</i> , как потенциальный якорный белок для дрожжевого дисплея.....	29
Цель и задачи работы	30
Материалы и методы	31
Результаты	41
Конструирование штаммов, использующих Pir1p <i>P. pastoris</i> и <i>S. cerevisiae</i> , в качестве якорного белка	41
Конструирование штаммов, использующих сигнальную последовательность Pho5p <i>S. cerevisiae</i>	42
Изучение эффективности систем дрожжевого дисплея на основе белков Pir1.....	45
Поиск новых якорных последовательностей.....	47
Сравнение кислых фосфатаз Pho5p <i>S. cerevisiae</i> и Pho1p <i>P. pastoris</i>	48
Изучение сигнальной последовательности Pho5p.....	49
Поиск домена, отвечающего за закрепление белка Pho5 на поверхности клетки ...	50
Заключение	59
Выводы.....	62
Список литературы	63
Благодарности	81

Список сокращений

В работе использованы следующие сокращения:

GPCR - G-protein-coupled receptors, рецепторы, ассоциированные с G-белками

ГФИ - гликозилфосфатидилинозитол

ЭПР - эндоплазматический ретикулум

DCW - dry cell weight, сухой вес клеток

MOPS - 3-[N-морфолино]-пропансульфоновая кислота

КФ - кислая фосфатаза

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПААГ - полиакриламидный гель

ТРИС – трис(гидроксиметил)аминометан

ПСА - персульфат аммония

ТЕМЕД - тетраметилэтилендиамин

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

SDS - додецилсульфат натрия

BSA - бычий сывороточный альбумин

ONPG - о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид

ак – аминокислота

В работе также использованы стандартные сокращения единиц измерения, общепринятые обозначения нуклеиновых кислот, нуклеотидов, а также культуральных сред. Названия генов и цитоплазматических факторов, а также обозначения фенотипов приведены с учетом правил номенклатуры дрожжей и бактерий

Введение

В 1980 годах была изобретена методика экспонирования антител на поверхности нитевидных фагов, она получила название фаговый дисплей. Эта методика позволяла эффективно отбирать специфичные к определенному антигену антитела и до сих пор широко применяется. Однако, в виду небольших размеров вирусов и их геномов, помещать на их поверхность крупные белки оказалось невозможно. Тогда для экспонирования более крупных белков стали использовать клетки бактерий. Недостатком бактериальных систем является их неспособность производить многие белки эукариот, поэтому для экспонирования эукариотических белков стали использовать дрожжи (Sheehan, Marasco, 2015; Ueda, 2016). Дрожжевой дисплей имеет широкий спектр приложений начиная от переработки отходов производств, например, целлюлозы, крахмала или других высокомолекулярных соединений, заканчивая чисто исследовательскими методами анализа белок-белковых взаимодействий (Shibasaki *et al.*, 2009; Andreu, Olmo del, 2018).

Для дрожжевого дисплея используют разные виды дрожжей. Особый интерес среди них представляют метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*, получившие широкое распространение в биотехнологии. Дрожжи *P. pastoris* способны расти на средах достаточно простого состава и при этом достигать высоких значений плотности культуры, так как они являются облигатными аэробами. Среди других преимуществ дрожжей *P. pastoris* можно выделить наличие сильных и при этом строго регулируемых промоторов, например, промотор гена *AOX1*, индуцируемого наличием метанола в среде. Эти факторы сделали *P. pastoris* одной из самых эффективных из известных систем экспрессии гетерологичных генов. Существует ряд примеров успешного синтеза белков дрожжами *P. pastoris*, которые ранее не удавалось синтезировать с помощью других систем (Cregg *et al.*, 1993). Все это делает *P. pastoris* очень перспективным объектом для использования в дрожжевом дисплее.

Для конструирования эффективных систем дрожжевого дисплея необходимо правильно подобрать сразу несколько компонентов: промотор, сигнальную последовательность и якорный белок, участвующий в закреплении целевого белка на поверхности клетки. От них будет зависеть общий уровень синтеза целевого белка, а также его стабильность и активность. В связи с этим, поиск новых сигнальных последовательностей и якорных белков представляет собой чрезвычайно важную

задачу. В данной работе была исследована возможность применения сигнальной последовательности белка Pho5 *Saccharomyces cerevisiae* для секреции рекомбинантных белков в *P. pastoris*, а также сделаны первые шаги в поиске якорного домена белка Pho5.

Дрожжевой дисплей - передовое направление современной биотехнологии (обзор литературы)

История развития технологий иммобилизации белков

За последние десятилетия технологии иммобилизации белков на различных поверхностях получили широкое распространение. Одним из направлений является использование биологических систем в качестве платформ для закрепления белков и пептидов. Начало ему было положено в 1985 году, когда было показано, что за счет слияния последовательностей генов, кодирующих белок оболочки вируса и целевой пептид, можно получить вирусные частицы, несущие этот пептид на своей поверхности (Smith, 1985). Эта технология получила название фаговый дисплей. На ее основе были созданы методики, широко используемые до сих пор для высокопроизводительного скрининга белковых библиотек, в частности фрагментов антител (Bábícková *et al.*, 2013; Omidfar, Daneshpour, 2015). Однако, в виду небольших размеров вирусных частиц, экспонировать на их поверхность крупные белки оказалось невозможно. Впоследствии были разработаны системы, лишенные этих ограничений - бактериальный и дрожжевой дисплей, а также технологии иммобилизации белков на поверхности клеток насекомых и млекопитающих.

Технология дрожжевого дисплея заключается в экспрессии генов химерных белков, состоящих из белка клеточной стенки, отвечающего за закрепление в клеточной стенке, и целевого белка. Исследовательская группа Шредера в 1993 впервые получила штамм дрожжей *S. cerevisiae*, экспонирующий на своей поверхности гетерологичный белок (Schreuder *et al.*, 1993). Несколькими годами позже дрожжевой дисплей использовали для отбора фрагментов антител с нужными свойствами из библиотеки случайных мутантов (Boder, Wittrup, 1997), открыв дорогу для применения дрожжевого дисплея в белковой инженерии. Помимо *S. cerevisiae* в качестве платформ для экспонирования различных белков используются и другие виды дрожжей, такие как *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* и дрожжи рода *Kluyveromyces* (Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2012; Bielen *et al.*, 2014).

Дрожжевой дисплей обладает рядом преимуществ перед другими клеточными системами и охарактеризован некоторыми исследователями как один из наиболее перспективных подходов для белковой инженерии (Angelini *et al.*, 2015; Cherf, Cochran, 2015; Sheehan, Marasco, 2015; Han *et al.*, 2018). Дрожжи, будучи эукариотами, могут

осуществлять различные посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование и образование дисульфидных связей, фолдинг и секрецию эукариотических белков. Дрожжевой дисплей дает возможность катализировать реакции на крупных субстратах, которые не могут попасть в клетку, а также в условиях, неоптимальных для работы фермента. Помимо этого он позволяет повысить устойчивость целевого белка к изменениям pH, температуры, наличию органических растворителей, протеаз и даже улучшить его кинетические свойства. Попадание синтезируемого фермента в конечный продукт при этом может быть полностью исключено (Hartmann, Kostrov, 2013). Для измерения количества белка, экспонированного клеткой, и изучения его взаимодействия с субстратом, как и в случае бактериального дисплея, можно использовать проточную цитофлуориметрию. Дрожжи как и бактерии не требуют для культивирования особых технических затрат и для них разработано большое количество генетических методов. При этом, в связи с большим размером клеток дрожжей, на их поверхности размещается больше молекул целевого белка (порядка 10^4 - 10^5), и их проще отделить от среды (Andreu, del Olmo, 2014; Neuh *et al.*, 2015).

У дрожжевого дисплея есть и недостатки, в частности, в области скрининга антител. По теоретическим оценкам при трансформации дрожжей возможно получить максимум 10^9 различных клонов, а при использовании фагов размер библиотеки антител может достигать 10^{12} . Помимо этого, большее количество экспонированных белков способствует отбору их по авидности, а не по аффинности. Чтобы нивелировать эти недостатки были разработаны стратегии, комбинирующие дрожжевой и фаговый дисплей (Bidlina *et al.*, 2015).

Стоит отметить, что существуют и технологии иммобилизации белков без использования клеток, такие как рибосомный, мРНК и аптамерный дисплей, дисплей, основанный на цис-активности (cis-activity-based) и ковалентный дисплей антител (covalent antibody display) (Galán *et al.*, 2016). Эти технологии обладают такими преимуществами, как большое разнообразие библиотек, скорость исполнения, а также возможностью использования аминокислот и нуклеотидов, не встречающихся в природе. Однако все эти методы гораздо более сложные с технической стороны.

Области применения дрожжевого дисплея

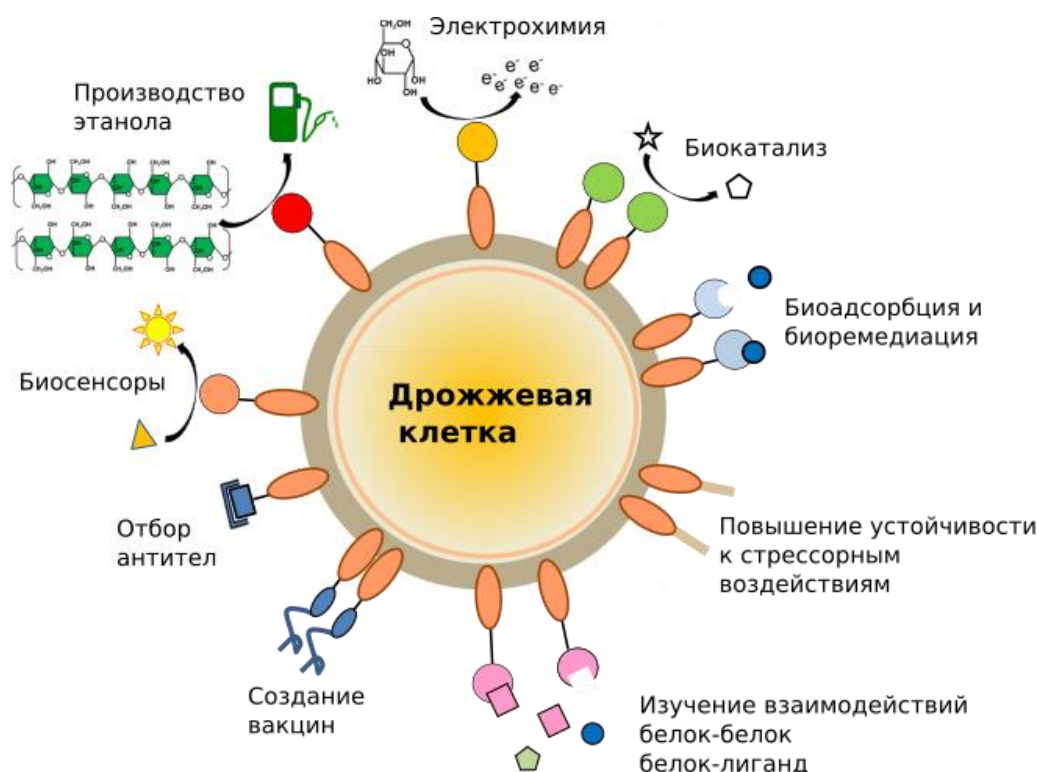


Рисунок 1. Области применения дрожжевого дисплея (с изменениями по Andreu, del Olmo, 2018).

Дрожжевой дисплей в производстве биотоплива

Производство биотоплива, в первую очередь этанола, из отходов производства, таких как крахмал и целлюлозная биомасса является очень перспективным направлением современной биотехнологии.

Переработка крахмала гораздо проще, чем целлюлозы, что делает его хорошим источником для производства биотоплива. Производство этанола из крахмала в промышленных масштабах включает в себя несколько стадий: желатинизации нерастворимого крахмала отвариванием при 140-180°C, обработки ферментами (α -амилазой, глюкоамилазой) и ферментация глюкозы в этанол дрожжами. Дисплей амилалитических ферментов на поверхности клеток дрожжей значительно упрощает этот процесс. Глюкоамилазы *Rhizopus oryzae*, экспонированные на поверхности клеток дрожжей за счет α -агглютинина, позволяют осуществлять прямое производство этанола из крахмала, за счет гидролиза крахмала ферментами, расположенными на поверхности клеток, и последующей ферментации дрожжами полученных сахаров

(Murai *et al.*, 1997). Одновременная иммобилизация нескольких белков на поверхности позволяет повысить эффективность процесса. Созданы штаммы, в которых помимо глюкоамилазы, экспонируется α -амилаза *Bacillus stearothermophilus* или *Streptococcus bovis* (Murai *et al.*, 1999; Shigechi *et al.*, 2004). Эти модифицированные дрожжи демонстрируют повышенную продукцию этанола и быстрый рост на крахмале как единственном источнике углерода.

Для эффективной деградации целлюлозы необходима совместная работа трех групп ферментов: эндоглюканаз, целлобиогидролаз и β -глюкозидаз (Lynd *et al.*, 2005). В связи с этим важно иметь возможность проводить одновременный дисплей нескольких белков на поверхности дрожжей. Одновременный дисплей карбоксиметилцеллюлазы и β -глюкозидазы BGL1 *Aspergillus aculeatus* в *S. cerevisiae* позволил модифицированному штамму ассимилировать целлобиозу и различные олигосахариды и расти на среде, содержащей эти соединения в качестве единственного источника углерода (Murai *et al.*, 1998). Дрожжи одновременно экспонирующие эндоглюканазу II (EGII), целлобиогидролазу II (CBHII) *Trichoderma reesei* и BGL1 *A. aculeatus* могут производить этанол непосредственно из целлюлозы, обработанной ортофосфорной кислотой (Fujita *et al.*, 2004).

Были также предприняты попытки получить ферменты с повышенной специфичностью к тому или иному субстрату. Так в жидкой среде, где источником углерода служили измельченные газеты, были отобраны комбинации штаммов дрожжей, экспонирующие мутантные варианты эндоглюканазы II, которые росли активнее штаммов дикого типа (Nakanishi *et al.*, 2012b).

В природе известны целлюлосомы - мультиферментные комплексы, состоящие из белка каркасного белка (scaffold protein) и взаимодействующих с ним различных гидролаз. Эти комплексы продуцируются некоторыми видами рода *Clostridium* и играют важную роль в разрушении полисахаридов клеточной стенки растений. Комплекс собирается за счет взаимодействия когезиновых доменов каркасного белка и докеринных доменов ферментов. Были предприняты попытки реконструкции целлюлосом в дрожжах. Так был сконструирован штамм, экспонирующий химерный каркасный белок, содержащий 3 когезиновых домена из *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum* и *Ruminococcus flavefaciens*. Инкубация этого штамма с тремя рекомбинантными целлюлазами (EG, CBH и BGL), произведенными *Escherichia coli* и несущими докеринные домены, позволила дрожжам перерабатывать целлюлозу (Bae *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2009). Была также опробована система совместного

культивирования нескольких штаммов дрожжей (Goyal *et al.*, 2011). В этой системе сборка миницеллюлосом достигалась за счет одновременной культивации штамма, экспонирующего белок скаффолда, и штаммов, секретирующих три типа целлюлаз, имеющих докериновые домены. На данный момент максимальное количество белков в миницеллюлосоме равняется трем, тогда как в настоящих целлюлосомах помимо нескольких форм целлюлаз, присутствуют различные дополнительные белки, например, ксиланазы, арабинофуранозидазы и экспансины (участвуют в разрушении связей между микрофибриллами целлюлозы, повышая эластичность клеточной стенки). Штамм одновременно экспонирующий белок сволленин (swollenin) - экспансин-подобный белок из *Trichoderma reesei* и целлюлазу, показал в 2.9 раз большую активность при деградации целлюлозы, чем штамм, экспонирующий одну целлюлазу (Nakatani *et al.*, 2013).

Гемицеллюлоза, включая ксилан, - еще один важный компонент биомассы целлюлозы и ее деградация важна для полного использования биомассы. Ксилан гидролизуются до ксилоолигосахаридов эндо- β -ксилазазами. Они в свою очередь гидролизуются β -ксилозидазами до D-ксилозы. Были получены штаммы *S. cerevisiae*, коэкспонирующие ксиланазу II (XYN II) *T. reesei* и β -ксилозидазу (XylA) *A. oryzae*, которые могут осуществлять деградацию ксиланов до ксилозы. На их основе были получены штаммы, синтезирующие ксилоредуктазу и ксилитолдегидрогеназу *Pichia stipitis* и ксилулозокиназу *S. cerevisiae*, способные усваивать ксилозу, и таким образом осуществляющие полный процесс превращения гемицеллюлозы в этанол (Katahira *et al.*, 2004; Katahira *et al.*, 2006).

Лигнин, также присутствующий в биомассе целлюлозы, мешает работе целлюлаз, маскируя фибриллы целлюлозы. Был сконструирован штамм *S. cerevisiae*, способный осуществлять разрушение лигнина, экспонирующий на своей поверхности лакказы (laccase) из грибов белой гнили. Использование этого штамма для переработки распаренной рисовой соломы повысило выход этанола (Nakanishi *et al.*, 2012a).

Дрожжевой дисплей в производстве химических соединений

Для производства различных химических веществ (e.g., 1,3-пропандиола, янтарной и лимонной кислот) из глюкозы, сахарозы, глицерина и других субстратов (Becker, Wittmann, 2012) в биотехнологии используют бактерии и дрожжи. Чтобы повысить экономическую выгоду этих процессов, необходимо производить эти

вещества из дешевых и легко доступных субстратов. Дрожжевой дисплей, позволяющий использовать отходы производства, может решить эту проблему.

Экспонирование экзоинулиназы на поверхности клеток *Y. lipolytica* позволяет производить лимонную и изолимонную кислоты в концентрациях до 77.9 г/л и 5.3 г/л из инулина с добавлением инулиназы в концентрации 181.6 ед.а./г инулина (Liu *et al.*, 2010). Штаммы дрожжей с дизрупцией гена пируват декарбоксилазы, замененного на ген L-лактат дегидрогеназы быка, и экспонирующие β -галактозидазу *Aspergillus aculeatus* способны синтезировать молочную кислоту непосредственно из целлобиозы, с выходом, сравнимым с использованием глюкозы в качестве источника углерода (Ishida *et al.*, 2005; Tokuhira *et al.*, 2008).

Липаза *R. oryzae* (ROL) и липаза В *Candida antarctica* (CALB) являются одними из наиболее изученных и используемых в промышленности липаз. Липазы экспонированные на поверхности клеток дрожжей демонстрируют большую активность, по сравнению с доступными коммерческими липазами, как свободными, так и иммобилизованными на органических подложках (Breinig, Schmitt, 2002; Shiraga *et al.*, 2005a; Washida *et al.*, 2001). Штаммы, экспонирующие различные липазы, способны синтезировать сложные метиловые эфиры из триглицеридов и метанола, также они могут быть использованы для синтеза определенных оптических изомеров (R,S)-1-бензилокси-3-хлор-2-пропил моносукцината и этилгексаноата (Matsumoto *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2006). С помощью дрожжевого дисплея также удалось отобрать мутантные варианты CALB, обладающие повышенной термостабильностью при их иммобилизации на поверхности клеток дрожжей (Kato *et al.*, 2007).

Дрожжевой дисплей можно использовать для получения изофлавоновых агликонов, структурных гомологи эстрогенов, а также карнозиновых и хитозановых олигосахаридов, обладающих антиоксидантной и противоопухолевой активностью. Синтез карнозина из β -аланина и гистидина удалось осуществить за счет дисплея карнозины (CN1) человека, а изофлавоновых агликонов за счет β -глюкозидазы (Fukuda *et al.*, 2007; Kaya *et al.*, 2008; Inaba *et al.*, 2010).

Дрожжевой дисплей в процессах биоадсорбции тяжелых и редких металлов и биоремедиации

За последние десятилетия огромное количество тяжелых металлов попало в окружающую среду, что представляет собой глобальную экологическую проблему.

Ценные редкие металлы (e.g. Pd, Mo, Ni и Pt) и токсичные тяжелые металлы (e.g. Zn, Cu и Cd) часто обнаруживаются в сточных водах. В отличие от органических загрязнений металлы не разлагаются, и единственным путем детоксикации в данном случае является их абсорбция (Fu, Wang, 2011). Помимо этого, редкие металлы важны для большинства высокотехнологичных производств (Kuroda, Ueda, 2010). Таким образом, эффективное извлечение металлов из сточных вод и промышленных отходов является очень важной задачей, как с точки зрения повторного использования ресурсов, так и с точки зрения очистки окружающей среды.

Традиционным физико-химическим методам получения ионов металлов, недостает специфичности и чувствительности. Другой подход - накопление металлов внутри клеток затрудняет их извлечение (Li *et al.*, 2013). Биоадсорбция - экстраклеточное связывание ионов металлов микроорганизмами за счет олигосахаридов и пептидов - позволяет решить обе эти проблемы (Kuroda, Ueda, 2010). Для сорбции ионов металлов используются следующие пептиды и белки: гекса-His, NP пептиды, имеющие CXXEE металл-связывающий мотив бактериальной P1 АТФазы, транспортирующей Pb^{2+} , и металлотионеины (Kuroda *et al.*, 2001; Kuroda, Ueda, 2006; Kotrba, Ruml, 2010). Для специфического связывания некоторых типов ионов могут быть использованы металлсвязывающие транскрипционные факторы. Поглощение молибдена, одного из редких металлов, клетками *E. coli* регулируется транскрипционным фактором ModE, который связывает молибдат (MoO_4^{2-}) (Grunden *et al.*, 1996). Экспонирование С-концевого домена ModE на поверхности клеток *S. cerevisiae* позволило достичь эффективной сорбции молибдата, более 50% которого можно было извлечь путем последующей обработки клеток папаином (Nishitani *et al.*, 2010). Единичная мутация в металлсвязывающем сайте ModE позволяет изменить его специфичность на связывание вольфрамата (WO_4^{2-}), тогда как нативный белок связывает и молибдат, и вольфрамат (Kuroda *et al.*, 2012). Для связывания диоксида урана (UO_2) - одного из наиболее востребованных металлов, можно использовать мутантный Ni^{2+} -зависимый транскрипционный фактор (NikRm) *E. coli*, селективно связывающий ионы диоксида урана. NikRm экспонированный на поверхности клеток *S. cerevisiae* привел к эффективной сорбции ионов диоксида урана (Kuroda *et al.*, 2014).

Помимо ионов металлов можно избавляться и от других типов загрязнений. Так, иммобилизация рецептора эстрогена крысы (ERLBD) на поверхности клеток *S. cerevisiae* позволила им эффективно связывать эстроген-подобные молекулы со сродством близким к нативному рецептору (Yasui *et al.*, 2002).

Фосфорорганические соединения - широко используемый класс пестицидов, применение которых наносит вред окружающей среде. Для деградации фосфорорганических соединений можно использовать органофосфорную гидролазу (ОРН) из бактерий рода *Flavobacterium*. Дрожжи, экспонирующие этот белок способны разрушать параоксон - высокотоксичное соединение, необратимо ингибирующее холинэстеразу (Takayama *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2010a).

На основе штаммов, экспонирующих ОРН, также были разработаны сенсорные системы для определения концентрации органофосфатов в среде. В одной системе, экспонирующей, помимо ОРН, зеленый флуоресцентный белок EGFP, детекция органофосфатов происходит за счет изменения интенсивности свечения EGFP, так как высвобождающиеся при разрушении органофосфатов протоны влияют на интенсивность свечения EGFP (Fukuda *et al.*, 2010b). В другой системе концентрация органофосфатов измеряется за счет оценки количества р-нитрофенола, высвобождаемого при гидролизе органофосфатов (Takayama *et al.*, 2011).

Дисплей в белковой инженерии

Отсутствие необходимости в очистке и концентрации целевых белков в дрожжевом дисплее, позволяет использовать его для высокопроизводительного скрининга белковых библиотек. Так, с помощью дрожжевого дисплея были отобраны варианты lid домена липазы *R. oryzae* с повышенной специфичностью к субстратам с короткой углеродной цепью; нейролизина, с измененной субстратной специфичностью; а также люциферазы, используемые в пиросеквенировании (Shiraga *et al.*, 2005b; Kadonosono *et al.*, 2008; Fushimi *et al.*, 2013; Miura *et al.*, 2015).

Как и фаговый дисплей, дрожжевой дисплей, может быть использован для поиска антител, высокоспецифичных к определенному антигену. Так были получены антитела к ботулотоксину, карциноэмбриональному антигену, дифтерийному токсину, лизоциму и стрептавидину (Graff *et al.*, 2004; Razai *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

Существуют и более сложные системы, например, для анализа взаимодействия GPCR рецепторов с различными лигандами. Лиганд иммобилизуется на мембране клетки с участием белка Yps1p, где он может взаимодействовать с GPCR рецептором. Сигнал от рецептора активирует экспрессию EGFP, находящегося на плазмиде. Эта система была опробована для изучения рецептора Ste2 *S. cerevisiae*, и рецептора соматостатина (SSTR2) человека (Hara *et al.*, 2012a; Hara *et al.*, 2012b).

Дрожжевой дисплей в медицине и научных исследованиях

Дрожжевой дисплей также можно использовать для неинвазивного анализа изменений окружающей среды или мониторинга продукции гетерологичных белков. Для этой цели несколько вариантов флуоресцентных белков, находящихся под контролем различных промоторов, экспонируются на поверхности клеток. Например, был создан штамм, на поверхности которого иммобилизованы белки GFP и BFP, синтез которых находится под контролем промоторов *GAPDH*, активируемого наличием глюкозы, и *UPR-ICL* из *Candida tropicalis*, активируемого голоданием по глюкозе, соответственно. Клетки данного штамма флуоресцируют зеленым светом при наличии глюкозы в среде и синим светом при недостатке глюкозы (Shibasaki *et al.*, 2001a). Аналогичный подход был использован для создания системы измерения внутри- и внеклеточной концентраций фосфата и аммония с использованием промоторов генов *PHO5* и *MEP2* для регуляции экспрессии генов EGFP и EYFP (Shibasaki *et al.*, 2001b).

Дрожжевой дисплей находит применение и в медицине. На его основе ведутся работы по созданию оральных вакцин - клеток дрожжей экспонирующих антигены патогенов. Так был разработан штамм *P. pastoris* на поверхности клеток которого иммобилизован гемагглютинин высокопатогенного штамма вируса птичьего гриппа (подтип H5N1). Добавление этого штамма в куриный корм привело к появлению у кур антител, нейтрализующих вирус (Wasilenko *et al.*, 2010).

Способность дрожжей осуществлять посттрансляционные модификации, позволяет экспонировать на их поверхности сложные гетеро-олигомерные белки. Сконструированы штаммы, несущие на своей поверхности легкие цепи антител и секретирующие тяжелые цепи в среду. При этом на поверхности клеток происходит образование функциональных фрагментов F_{ab} антител. В качестве примера можно привести систему, экспонирующую F_{ab} фрагмент каталитического антитела 6D9, способного осуществлять гидролиз эфиров хлорамфеникола (Lin *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004). Такие антитела могут превращать неактивные предшественники лекарственных веществ в активные формы. Для диагностических целей были получены штаммы *S. cerevisiae*, экспонирующие ZZ домен белка A *Staphylococcus aureus* - повтор Z домена, связывающий F_c фрагмент IgG человека или кролика. Их можно использовать для детекции IgG и очистки IgG из сыворотки крови (Nakamura *et al.*, 2001).

Дрожжевой дисплей был также использован для получения штаммов *S. cerevisiae*, устойчивых к различным типам стрессорных воздействий. Так, была исследована устойчивость штаммов дрожжей, экспонирующих случайным образом синтезированные пептиды, к различным стрессорным факторам. В результате был обнаружен штамм устойчивый к повышенной кислотности среды, и было показано, что за этот эффект отвечает пептид Scr35 (25 аминокислот) (Matsui, Kuroda, Ueda, 2009). Также были получены штаммы, устойчивые к засолению, и повышенным концентрациям этанола и ацетонитрила *et al.*, 2014).

Состав и структура клеточной стенки дрожжей

Клеточная стенка дрожжей имеет толщину примерно 200 нм. У *S. cerevisiae* она составляет около 15-30% сухого веса вегетативных клеток. Основная функция клеточной стенки - поддержание формы клеток и осмотического давления. Клеточная стенка представлена двумя слоями. Внутренний слой, отвечающий за механическую прочность, состоит из β -1,3-глюканов, β -1,6-глюканов (вместе они составляют 50% общего веса клеточной стенки) и хитина (1–2%). Внешний слой, участвующий в межклеточном взаимодействии, состоит из сильно гликозилированных маннопротеинов (Cell Wall Proteins, CWP), большинство из которых ковалентно связано с сетью из глюканов (Kapteyn *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2002; Orlean, 2012).

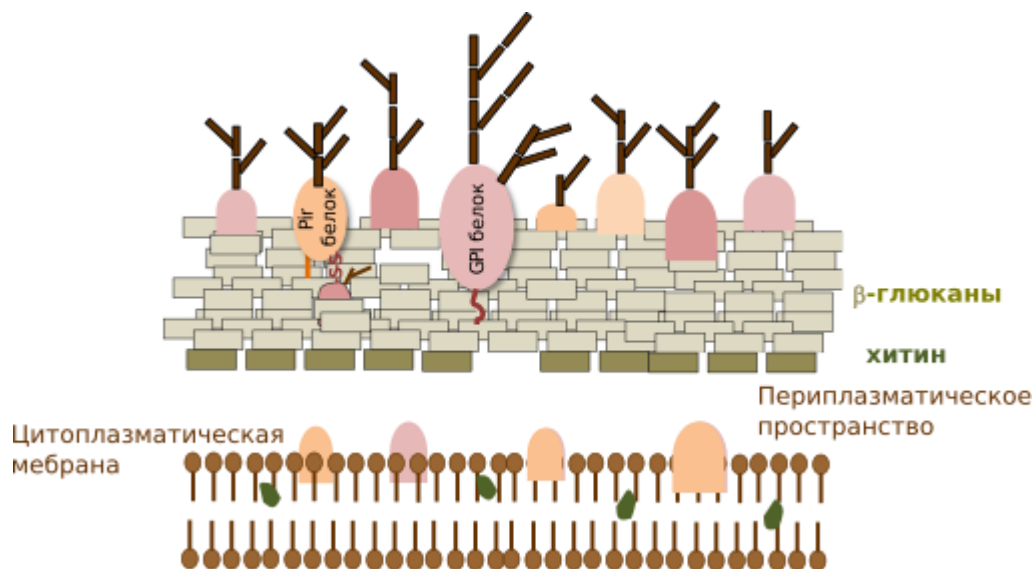


Рис 2. Схематическое представление клеточной стенки дрожжей (с изменениями по Andreu, del Olmo, 2018).

Часть белков клеточной стенки закрепляется за счет гликозилфосфатидилинозитолового якоря (ГФИ-якорь) - гликолипида, присоединяемого к гидрофобному региону на С-конце белка в эндоплазматическом ретикулуме. Помимо сигнальной последовательности на N-конце белка для попадания в ЭПР, эти белки часто имеют участок богатый серином и треонином. Из 60-70 белков этой группы, найденных с помощью анализа генома *S. cerevisiae*, около 40 расположены на поверхности плазматической мембраны, тогда как остальные закреплены на клеточной стенке за счет ковалентных связей с β -1,6-глюканом (Klis *et al.*, 2002). Белки с ГФИ-якорем могут быть удалены из клеточной стенки за счет обработки глюканазами.

Еще один класс белков клеточной стенки — белки семейства Pir (белки с инвертированными повторами, proteins with inverted repeats), ковалентно связанные с клеточной стенкой за счет цистеина и глутамина, образующих связи с β -1,3-глюканом (Yang *et al.*, 2014). Они могут быть выделены обработкой β -1,3-глюканазами (*e.g.* зимолиаза, ламинариназа) с SDS, а также обработкой слабощелочными растворами или меркаптоэтанолом (Castillo *et al.*, 2003).

Стоит заметить, что некоторые белки клеточной стенки секретируются в периплазматическое пространство и закрепляются в клеточной стенке за счет водородных связей с β -1,3-глюканами, такие белки можно выделить путем обработки SDS, меркаптоэтанолом, дитиотреитолом или комбинацией этих веществ (Bielen *et al.*, 2014).

Было также показано, что процесс формирования специфических белок-полисахаридных комплексов сильно зависит от условий среды (наличия питательных веществ, pH, температуры и наличия кислорода) и фазы клеточного цикла (Klis *et al.*, 2002; Aguilar-Uscanga, Francois, 2003).

Якорные белки *S. cerevisiae*, используемые для дрожжевого дисплея

Для закрепления целевого белка на поверхности клетки используются белки клеточной стенки или их фрагменты. Конструкция, кодирующая химерный белок, должна быть либо интегрирована в геном или поддерживаться экстра-хромосомно в составе плазмиды. В настоящее время изучено большое количество якорных белков. Наиболее широко используют следующие белки: Sag1 (AG α 1), Aga1-Aga2, Fig2, Flo1,

Sed1, Spi1, Cwp1/2, Tip1, Tir1 и Pir1/2/3/4. Они отличаются друг от друга по разным показателям: механизму взаимодействия с клеточной стенкой, свободному концу, к которому может быть присоединен целевой белок, а также по равномерности распределения на поверхности клетки и уровню синтеза в различные фазы клеточного цикла. Все эти белки можно подразделить на три группы в зависимости от механизма крепления к клеточной стенке: ГФИ-заякоренные, FS/FL и Pir (рис. 2).

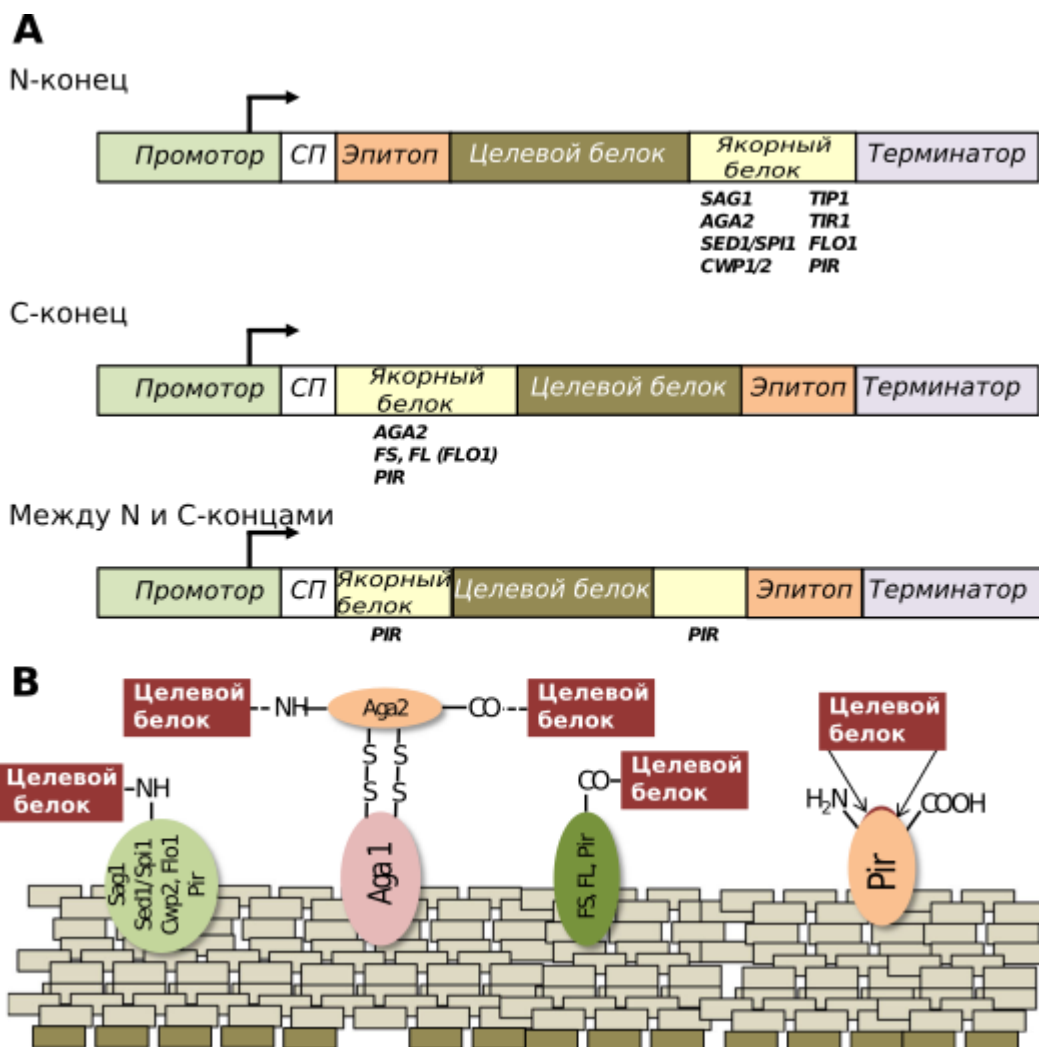


Рисунок 3. Классификация якорных белков по типу соединения с целевым белком. А - типичные конструкции, используемые в дрожжевом дисплее. СП - сигнальный пептид. Под сигнальным пептидом, якорным белком, целевым белком и эпитопом имеются в виду кодирующие их последовательности. Указано расположение целевого белка по отношению к якорному белку. В - различные возможные варианты слияния целевых белков с якорными белками (с изменениями по Andreu, del Olmo, 2018).

Гликозилфосфатидилинозитольные якоря

Белки, закрепленные на поверхности клетки за счет ГФИ-якоря, имеют сигнальный пептид, за процессинг которого у *S. cerevisiae* отвечает эндопептидаза Kex2, находящаяся в транс-цистернах аппарата Гольджи. Белки сначала экспортируются на поверхность мембраны, где их связь с липидами мембраны разрушается фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазой C, и они попадают в клеточную стенку. Там они закрепляются за счет ковалентной связи между остатком ГФИ-якоря и β -1,6-глюканом (Kapteyn *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1994). Так как C-концы этих белков участвуют в их заякоривании, целевой белок может находиться только на N-конце якорного белка, что является главным недостатком таких систем.

α -агглютинин - Sag1 (AGa1). α -агглютинин и а-агглютинин — два взаимодействующих друг с другом гликопротеина клеточной стенки, опосредующих адгезию клеток *S. cerevisiae* в процессе полового размножения. Гены этих белков экспрессируются в гаплоидных α и а клетках, соответственно. При их взаимодействии происходят конформационные изменения, определяющие его высокую аффинность (Cappellaro *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2001). Белок AGa1 кодируется геном *SAG1* (Sexual AGglutination 1). Ген имеет низкий уровень конститутивной экспрессии, повышение которой вызывается феромонами клеток противоположного типа спаривания (Lipke, Kurjan, 1992). На N-конце белка AGa1 находится сайт связывания с а-агглютинином. Высокий уровень синтеза белка достигается за счет использования сильных промоторов генов *ADHI*, *TDH3* или *GALI*. AGa1 был первым белком, использованным для экспонирования гетерологичных белков на поверхности клеток дрожжей, (Schreuder *et al.*, 1993) и является наиболее широко используемым до сих пор.

Для использования α -агглютинина в качестве якорного белка не требуются специальные штаммы. Однако, эффективность экспонирования целевого белка на поверхности клеток штаммов с делецией гена *SED1*, кодирующего белок Sed1, другой важного белка клеточной стенки, выше по сравнению с распространенными штаммами (Kuroda *et al.*, 2009; Kotaka *et al.*, 2010). Скрининг 61 мутантного штамма с дефектами клеточной стенки для поиска штамма, наиболее подходящего для одновременного дисплея нескольких белков, показал, что штаммы с делециями *bck1 Δ* , *slt2 Δ* , *scw4 Δ* , и *mnv2 Δ* подходят для этой задачи лучше штаммов дикого типа (Matsuoka *et al.*, 2014).

а-агглютинин - Aga1/Aga2. В отличие от других систем, а-агглютининовая состоит из 2 частей: субъединицы Aga1 (якорный компонент), которая связана с клеточной стенкой за счет ГФИ-якоря, и субъединицы Aga2 (адгезивный элемент), к которой присоединен целевой белок. Aga2 взаимодействует с Aga1 за счет двух дисульфидных связей образованных Cys7 и Cys50 (Cappellaro *et al.*, 1994). Так как субъединица Aga2 не связана с клеточной стенкой напрямую через ГФИ-якорь на С-конце, в отличие от AGA1, рассмотренного выше, целевой белок может находиться как с N- так и с С-конца. Разработаны коммерчески доступные плазмиды, позволяющие создавать С-концевые - pYD1, pCT (Kieke *et al.*, 1997; Chao *et al.*, 2006) и N-концевые - pYD5 (Wang *et al.*, 2005), pCHA (Mata-Fink *et al.*, 2013) химерные белки. Недавно, также была сконструирована плазида pCL, позволяющая использовать оба варианта, что дает возможность экспонировать на поверхности клетки одновременно два белка (Lim *et al.*, 2017).

Так как эта система состоит из двух компонентов, для ее эффективной работы необходимы высокие уровни синтеза белков Aga1 и Aga2. Чтобы обеспечить одинаковый уровень транскрипции генов AGA1 и AGA2 в большинстве случаев используют штамм EBY100 (*MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-Δ200 his3-Δ200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL*), в котором ген AGA1 находится под контролем промотора GAL1, как и в большинстве плазмид, используемых для конструирования химерных белков с Aga2 (Boder, Wittrup, 1997).

Wentz и Shusta обнаружили 5 генов, сверхэкспрессия которых повышает эффективность дисплея. Они кодируют: белки клеточной стенки - Ccw12 (*covalently linked cell wall protein 12*), Cwp2, Sed1, белок субъединицу рибосомы Rpp0 и белок резидент эндоплазматического ретикулума Ero1. Авторы предполагают, что эти белки способствуют синтезу и процессингу химерного белка, а также снижают стресс, вызванный наличием больших количеств гетерологичного белка на поверхности клеток (Wentz, Shusta, 2007). Возможность использования обоих концов якорного белка для создания химерных конструкций и доступность векторов для экспрессии делает конструкцию Aga1-Aga2 одной из наиболее используемых в дрожжевом дисплее. Она используется для иммобилизации белков главного комплекса гистосовместимости человека и различных антител. Стоит заметить, что были попытки использовать в качестве якорного белка продукт гена *FIG2 (YCR089W)* - паралога AGA. Однако, было показано, что несмотря на высокий уровень иммобилизации целевого

белка на поверхности клетки, его активность была довольно низкой (Van der Vaart *et al.*, 1997).

Sed1 и Spi1. Продукт гена *SEDI* (Suppression of Exponential Defect) - структурный белок клеточной стенки, закрепленный за ГФИ-якорь и сильно гликозилированный. Впервые он был выделен из клеток, обработанных SDS и протеазой I *Rarobacter faecitabidus* (RPI) (Shimoi *et al.*, 1998). Экспрессия гена *SEDI* наиболее высока в стационарной фазе, при этом белок составляет до 30% всех белков, извлекаемых RPI из клеточной стенки. Экспрессия гена *SEDI*, как и других белков, вовлеченных в организацию поверхности клетки, зависит от стадии клеточного цикла. В данном случае экспрессия максимальна в М фазе и была предложена функция Sed1p в реструктурировании клеточной стенки в процессе почкования (Caro *et al.*, 1998).

Первые эксперименты с Sed1 в качестве якорного белка, показали хорошие результаты. В системе с использованием α -галактозидазы в качестве целевого белка было показано, что как минимум 74% активности фермента проявляется на поверхности клетки (Van der Vaart *et al.*, 1997). В этой работе использовали промотор *GALI*, сейчас в большинстве работ используют собственный промотор *SEDI*, основываясь на данных, свидетельствующих в пользу максимальной экспрессии гена *SEDI* в стационарную фазу (Inokuma *et al.*, 2014). Использование промотора *SEDI* позволяет достичь эффективного экспонирования целевого белка в течение 36 часов без смены культуральной среды и изменения источника углерода. Это также упрощает конструирование плазмид. Несколько работ описывают успешное применение Sed1 в качестве якорного белка для дисплея липаз и целлюлаз (Sun *et al.*, 2012; Inokuma *et al.*, 2014).

У гена *SEDI* есть паралог - *SPII* (stationary phase induced 1), индуцируемый диауксическим сдвигом, переходом с дыхательного метаболизма на ферментативный (Puig, Pérez-Ortín, 2000). Экспрессия гена находится на высоком уровне в течение 3 дней и достигает максимума к 36 часу культивирования (Cardona *et al.*, 2012). Интересной особенностью этого гена, является его активная транскрипция в ответ на действие стрессорных факторов, таких как повышенное осмотическое давление, тепловой шок, голодание по азоту, повышенные концентрации этанола и ацетальдегида, окислительный стресс, а также изменения кислотности среды (Gasch *et al.*, 2000; Aranda, del Olmo, 2004).

Недавно было показано, что при использовании собственного промотора *SP11*, помимо изменения источника углерода синтез химерного белка индуцируют непродолжительные (до 24 часов) воздействия стрессорных факторов (Andreu, del Olmo, 2017). В связи с чем представляется интересным использование промотора *SP11* для конструирования штаммов, экспонирующих белки, которые могут помочь им справиться со стрессорными факторами.

Cwp2 (cell wall protein 2). Cwp2 был обнаружен среди белков, экстрагируемых обработкой глюканазами. Он играет важную роль в поддержании стабильности клеточной стенки и составляет большую часть поверхностных белков (Vaart van der *et al.*, 1995). В 1997 та же исследовательская группа использовала этот белок для иммобилизации α -галактозидазы на поверхности клетки. (Van der Vaart *et al.*, 1997) Позже белок был использован и в других системах (Lilly *et al.*, 2009).

Другие белки клеточной стенки с ГФИ-якорями (Cwp1, Tip1, Tir1, Gas1, Yarp3, Crh2 и Csw14) также были рассмотрены для использования в дрожжевом дисплее, но никаких подтверждений целесообразности их использования на данный момент не было получено (Van der Vaart *et al.*, 1997; Andr s *et al.*, 2006).

FS и FL домены белка Flo1

Flo1 (flocculation protein 1) - маннозо-специфичный лектин-подобный белок клеточной стенки, участвующий в флокуляции (Kobayashi *et al.*, 1998). Было показано, что регион на N-конце белка, так называемый функциональный домен флокуляции, взаимодействует с компонентами клеточной стенки, такими как маннаны, и вызывает слипание клеток (Goossens *et al.*, 2011). На гидрофобном C-конце белка имеется последовательность для присоединения ГФИ-якоря, однако механизм закрепления флокулина на поверхности клетки еще до конца не изучен. Делеция этого гидрофобного региона приводит к невозможности заякоривания белка, однако, возможность экстракции флокулина из клеточной стенки непродолжительной обработкой горячим SDS говорит о том, что белок связан с клеточной стенкой нековалентными связями (Bony *et al.*, 1997).

Помимо этого, было описано использование фрагментов Flo1: FS (Flo1 short, с 1 по 1099 аминокислоту) и FL (Flo1 long, с 1 по 1447 аминокислоту) в качестве якорных белков для экспонирования липазы *Rhizopus oryzae*. Оба фрагмента содержат

секреторную последовательность, функциональный домен флокуляции и некоторые элементы центрального региона, но участок прикрепления ГФИ-якоря отсутствует. В обоих случаях целевой белок присутствовал на поверхности клеточной стенки и был активен, что говорит о наличии нескольких механизмов крепления Flo1 к клеточной стенке. Возможно, в данном случае белок крепится за счет взаимодействий между функциональным доменом флокуляции и маннанными остатками клеточной стенки (Matsumoto *et al.*, 2002).

Стоит отметить, что белок Flo1 может быть использован и для N-концевых слияний. Было показано, что C-концевые фрагменты Flo1, содержащие 42, 102, 146, 318, 428 и 1326 аминокислот, могут быть использованы для экспонирования глюкоамилазы. Авторы отмечают, что целевой белок был иммобилизован на поверхности клеток во всех случаях, однако увеличение длины якорного белка повышает уровень целевого белка на поверхности клетки и его активность (Sato *et al.*, 2002).

Белки семейства Pir

Белки Pir - консервативное семейство белков клеточной стенки, главной особенностью которых является наличие аминокислотных повторов (SQIGDGQIQAT). Помимо внутренних повторов, эти белки характеризуются наличием N-концевого сигнального пептида, отщепляемого сериновой протеазой Kex2 в аппарате Гольджи, и консервативного региона на C-конце с 4 остатками цистеина. Это семейство белков обнаружено у различных видов дрожжей, таких как *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida albicans* и *Yarrowia lipolytica*. У *S. cerevisiae* это семейство белков включает в себя Pir1/CCW6 (есть паралог Pir5), Pir2/HSP150/CCW7, Pir3/CCW8 и Pir4/CCW5. Последний содержит только один внутренний повтор, тогда как Pir1, 2 и 3 могут иметь от 7 до 11 копий.

Существуют два механизма взаимодействия Pir белков с клеточной стенкой. Первый заключается в образовании сложноэфирных связей между β -1,3-глюканами и γ -карбоксильными группами второго глутаминового остатка внутренних повторов. Второй в образовании дисульфидных связей между остатками цистеина на C-конце и белками компонентами клеточной стенки (Castillo *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2014).

Отличительной особенностью белков этого семейства, применительно к дрожжевому дисплею, является разнообразие стратегий для создания химерных

белков. Первая стратегия состоит в присоединении целевого белка с N-конца, в этом случае в заякоривании химерного белка участвуют остатки цистеина на С-конце. При этом участок, кодирующий сигнальную последовательность и про-пептид Pir белка, должны быть удалены. Вторая стратегия, как и для Aga2 и Flo1, позволяет присоединять целевой белок с С-конца. В этом случае заякоривание происходит за счет сложноэфирных связей между внутренними повторами и клеточной стенкой. Химерный белок при этом легко отделить от клеток, обработкой слабощелочными растворами, разрушающими сложноэфирные связи. Последняя стратегия - встраивание целевого белка между N- и С-концами белка Pir. Чаще всего она используется для Pir4, так как для его прочного взаимодействия с клеточной стенкой необходимы оба конца белка в виду наличия единственного повтора SQIGDGQIQAT. Было также показано, что в случае Pir4 часть белка секретируется в среду, и количество секретируемого белка пропорционально количеству повторов, для других белков этого семейства, однако, такая зависимость не подтвердилась (Andrés *et al.*, 2006; Mormeneo *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

Многообразие систем дрожжевого дисплея, основанных на белках Pir, позволяет эффективно использовать их для иммобилизации таких белков, как ксиланазы и гликозилтрансферазы, активные центры которых находятся близко к С-концу (Yang *et al.*, 2014). Преимуществом данных белков также является более прочное взаимодействие с клеточной стенкой по сравнению с Flo1.

При конструировании систем дрожжевого дисплея с использованием Pir белков стоит внимательно подходить к выбору правильного члена семейства. Например, при дисплее гликозилтрансфераз, было показано что Pir3p и Pir4p эффективнее чем Pir1p (Shimma *et al.*, 2006). Также было показано, что Pir3p и Pir4p более равномерно распределены по поверхности клетки, тогда как Pir1 и Pir2 чаще локализованы в области “родовых шрамов” (Sumita *et al.*, 2005).

Некоторые авторы отмечают, что более высокий уровень целевого белка на поверхности клеток достигается в штаммах с делециями генов *PIR1/2/3*. Штаммы с делецией гена *SEDI* также демонстрируют повышенную активность некоторых целевых белков при использовании белков семейства Pir (Abe *et al.*, 2004; Shimma *et al.*, 2006).

Помимо вышеперечисленных существует большое количество белков клеточной стенки, для которых применимость в дрожжевом дисплее еще не была

изучена, например белки Scw4 и Scw10 (soluble cell wall proteins) и Tos1 (Target of Sbf1) схожие с Pir белками (de Groot *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2005).

Другие виды дрожжей, используемые в дрожжевом дисплее

Помимо *S. cerevisiae* для дрожжевого дисплея используются и другие виды дрожжей, такие как *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces sp.*

H. polymorpha - вид метилотрофных дрожжей, используемых для экспрессии гетерологичных белков. Для *H. polymorpha* в качестве якорных белков используются белки Sed1, Gas1, Tip1 и Cwp1. Наилучшие результаты, в плане активности целевого белка, были достигнуты с использованием Cwp1 (Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007). В качестве промотора используют промотор гена *GAPDH* *H. polymorpha*, кодирующего глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу, участвующую в гликолизе. Сигнальные последовательности берут от киллерного токсина *K. lactis* или α -амилазы *Aspergillus oryzae*. Ко всем используемым якорным белкам целевой белок присоединять можно только с N-конца.

Естественная способность *Y. lipolytica* секретировать большие количества белка в среду находит широкое применение в производстве гетерологичных белков, и совсем недавно эти дрожжи были использованы для дрожжевого дисплея. Наиболее используемые якорные белки - нативные Cwp1/3/6 и Pir1 или Flo1 *S. cerevisiae* (Yuzbasheva *et al.*, 2011; Yuzbasheva *et al.*, 2015). В качестве сигнальных последовательностей используются таковые от белков Pir1 и Xpr2. Для высокого уровня экспрессии целевого белка чаще всего используют гибридный промотор *hp4d*, работа которого не зависит от фазы роста культуры. Реже промоторы генов *TEF1* и *GAL1* (Yue *et al.*, 2008; An *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016). По результатам анализа штаммов, экспонирующих на своей поверхности YILip2p с Pir2p в качестве якорного белка, на поверхности клетки находилось порядка $6 \cdot 10^5$ молекул белка, что близко к теоретическому максимальному значению (Yuzbasheva *et al.*, 2015). В экспериментах с ксиланазой TxXYN из *Thermobacillus xylanilyticus* было показано, что Pir1p является более эффективным якорем по сравнению с Cwp1, используемым ранее во многих работах (Duquesne *et al.*, 2014).

Некоторые виды *Kluyveromyces*, такие как *K. lactis* и *K. marxianus*, широко используются в промышленности для производства этанола из лактозы и синтеза

различных ферментов. Они получили распространение ввиду своей способности использовать лактозу как источник углерода, а также из-за устойчивости к повышенным температурам. Достоинством этих дрожжей является их безопасность для применения в пищевой промышленности (они имеют статус GRAS - generally recognized as safe). Несмотря на перспективность применения в промышленности, на сегодняшний день на основе *Kluyveromyces* было сконструировано очень мало систем дрожжевого дисплея. В существующих системах, в качестве промоторов используется промотор *PGK1 S. cerevisiae*, а секреторная последовательность взята от глюкоамилазы *R. oryzae*. В качестве якорного белка используется α -агглютинин *S. cerevisiae* (Yanase *et al.*, 2010). У *Kluyveromyces* были обнаружены гомологи белков Sp1 и Pir1/2/3 *S. cerevisiae*, которые потенциально могут быть использованы как якорные белки (Toh-*et al.*, 1993; Cardona, del Olmo, Aranda, 2012).

Дрожжи *P. pastoris* и их применение в дрожжевом дисплее

Компания Phillips Petroleum планировала использовать метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*) в качестве богатого белком корма для скота. Их выращивали на метаноле в качестве источника углерода. Однако, колеблющиеся цены на нефть и газ (сырьё для синтеза метанола) побудили компанию обратиться в Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA) чтобы разработать на основе *P. pastoris* системы для синтеза рекомбинантных белков (Wegner, 1986; Cregg *et al.*, 2000).

По сравнению с *S. cerevisiae*, *P. pastoris* обладает рядом преимуществ при использовании в биотехнологии. *P. pastoris* - облигатные аэробы, что позволяет их культурам достигать высоких плотностей до 130 г/л (Cregg *et al.*, 2000). Для *P. pastoris* разработаны системы синтеза как внутриклеточных, так и внеклеточных белков с использованием разнообразных промоторов (Cregg *et al.*, 2000). Использование сильного индуцибельного промотора *AOXI*, позволяет достигать больших количеств синтезируемого белка (до 22 г/л) (Hasslacher *et al.*, 1997). Кроме того, система гликозилирования отличается от таковой *S. cerevisiae*, и созданы модифицированные штаммы, почти полностью повторяющие паттерн гликозилирования белков млекопитающих (Wildt, Gerngross, 2005; Laukens *et al.*, 2015). Сейчас дрожжи *P. pastoris* широко используются в биотехнологии и синтетической биологии.

Промоторы генов *P. pastoris* и сигнальные последовательности, применяемые для экспрессии гетерологичных белков

Дрожжи *P. pastoris* способны использовать метанол в качестве единственного источника углерода и энергии. Для этого они обладают целым рядом ферментов, кодируемых *MUT*-генами (methanol utilization). Ген *AOX1* кодирует алкогольоксидазу - основной фермент пути утилизации метанола. Промотор этого гена является одним из самых сильных эукариотических промоторов. При этом, транскрипция генов под его контролем строго регулируется источником углерода в среде. Репрессия промотора большинством используемых источников углерода (глюкозой или глицерином) гарантирует рост биомассы перед тем, как будет синтезироваться целевой белок. Индукция достигается простым добавлением метанола в среду. Среди минусов следует отметить то, что метанол - быстро воспламеняющееся вещество и хранить его в больших объемах небезопасно. Также, приходится очищать дрожжи от токсичного метанола при их использовании в пищевой промышленности (Tschopp *et al.*, 1987; Cregg *et al.*, 1989; Inan, Meagher, 2001).

Ген *GAP* кодирует НАД-зависимую глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу. Промотор этого гена является конститутивным, и экспрессия идет на всех источниках углерода, включая глюкозу, глицерин, этанол и олеиновую кислоту. К плюсам использования этого промотора можно отнести отсутствие необходимости в смене источника углерода для индукции синтеза целевого белка, однако, при производстве токсичных для дрожжей белков, они могут погибнуть, не достигнув нужной биомассы (Waterham *et al.*, 1997).

Также можно использовать промоторы других генов: 1) *FLD1* (кодирует формальдегиддегидрогеназу), экспрессия которого активируется метанолом и алкилированными аминами, 2) *ICL1* (кодирует изоцитрат лиазу), репрессируемый глюкозой и индуцируемый этанолом, 3) *PEX8*, экспрессируемого конститутивно на низком уровне на среде с глюкозой и индуцируемого метанолом, 4) *YPT1*, обеспечивающем низкий конститутивный уровень синтеза на глюкозе, метаноле и маннитоле (Juturu, Wu, 2018).

Для эффективной секреции белков используются сигнальные последовательности как белков *P. pastoris*, так и других видов дрожжей. Наиболее часто используют сигнальные последовательности α -фактора (89 аминокислот) *S. cerevisiae*, α -амилазы (20 ак) *Aspergillus niger*, STA1 (18 ак) *Saccharomyces diastaticus*,

инулиназы (16 ак) *Kluyveromyces marxianus*, SUC2 (19 ак) *S. cerevisiae* и киллерного токсина (26 ак) *S. cerevisiae*. Недавно была обнаружена сигнальная последовательность α -фактора *P. pastoris* - CBS7435. Было показано, что эта сигнальная последовательность настолько же эффективна для секреции белков, как и сигнальная последовательность α -фактора *S. cerevisiae* (Küberl *et al.*, 2011)

Применение дрожжей *P. pastoris* в дрожжевом дисплее

Дрожжи *P. pastoris* получили широкое распространение в дрожжевом дисплее. Якорные белки, используемые для *P. pastoris* - Sag1p (С-концевой фрагмент), Aga1p, Sed1p, Tip1p, Aga2p и Flo1p (флокуляционный домен) *S. cerevisiae*, а также нативные белки Pir1/2 *P. pastoris* (Wang *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2010; Khasa *et al.*, 2011a; Li *et al.*, 2015). Предпринимаются попытки увеличения спектра нативных белков, применимых в качестве якорей. Так было идентифицировано 13 ГФИ-якорных белков *P. pastoris* и показано, что Gcw21p, Gcw51p и Gcw61p могут быть успешно использованы для дисплея CALB (Zhang *et al.*, 2013). *In silico* исследования генома *P. pastoris* привели к обнаружению гена, кодирующего белок Flo9 из семейства флокулинов, также как и Flo1, однако, гораздо меньше него (536 аминокислот) и было продемонстрировано его использование для иммобилизации EGFP и липазы В из *Candida antarctica* (CALB) (Mouga *et al.*, 2015). Для экспонирования белков млекопитающих используются специальные штаммы с модифицированной системой гликозилирования, в качестве якорного белка в этих штаммах часто используется Sed1 (Lin *et al.*, 2012). По некоторым оценкам количество иммобилизованных на поверхности клеток молекул белка, для CALB в системе с FS составляет 10^4 молекул на клетку (Liang *et al.*, 2013), а с использованием α -агглютинаина в качестве якоря - $9 \cdot 10^5$ (Jin *et al.*, 2014).

На основе штаммов *P. pastoris* были сконструированы эффективные системы дрожжевого дисплея. В качестве примера можно привести, штаммы, экспонирующие липазу В из *Candida antarctica* с использованием белков Flo9 (FLO9LIPB) и Pir1 (PIRLIPB) *P. pastoris* в качестве якорных белков. В обоих случаях фермент демонстрировал высокую активность (>100 и >80 ед.а./мг DCW, соответственно) к трибутирину при pH = 7 и 45°C в органических растворителях. Однако, конструкция с Pir1 продемонстрировала на 17% более специфическую активность чем с Flo9. Липазы, иммобилизованные на поверхности гораздо более стабильны, чем в свободном виде. Липаза на поверхности клеток сохраняла 85% активности при 40°C и 40% при 45°C после 3 часов работы, тогда как свободный фермент терял 60% активности в течение

10 минут при 45°C (Moura *et al.*, 2015). Также было показано, что липаза LipB52 из *Pseudomonas fluorescens* B52 стабильнее при экспрессии в *P. pastoris* и ее концентрация на поверхности клеток почти в 5 раз выше, чем в аналогичной системе для *S. cerevisiae* (Jiang *et al.*, 2008)

Также были сконструированы штаммы *P. pastoris* с микроцеллюлосами на поверхности. Штамм X33-FSCipA, экспонирующий каркасный белок CipA из *Clostridium acetobutylicum* и штамм X33-ND, секретирующий в среду эндоглюканазу (NtEG) термита *Nasutitermes takasagoensis*, имеющую докеринный домен NtEGD *C. acetobutylicum*. При совместной культивации этих штаммов в жидкой культуре было показано, что эффективность гидролиза карбоксиметил целлюлозы в данной системе в среднем на 25% выше, чем при использовании свободной эндоглюканазы NtEGD (Ou, Cao, 2014).

Кислая фосфатаза Pho5p *S. cerevisiae*, как потенциальный якорный белок для дрожжевого дисплея

Репрессибельная кислая фосфатаза Pho5p - принадлежит семейству кислых фосфатаз *S. cerevisiae*, куда также входят Pho3p, Pho10p и Pho11p. Экспрессия генов *PHO5*, *PHO10* и *PHO11*, кодирующих репрессибельные фосфатазы, осуществляется только при низкой концентрации фосфатов в среде, тогда как экспрессия *PHO3* является конститутивной (Toh-e *et al.*, 1978; Oshima, 1982). Гены *PHO5* и *PHO3* скорее всего возникли в результате дупликации, последовательности их промоторов идентичны на 65%, а самих фосфатаз на 82%. (Meyhack *et al.*, 1982; Bajwa *et al.*, 1984). Гены, кодирующие гомологичные белки, также есть у *K. lactis* (*KIPHO5*), *P. pastoris* (*PHO1*) и *Schizosaccharomyces pombe* (*PHO1*) (Fermiñán, Domínguez, 1997; Payne *et al.*, 1995). На N-конце кислых фосфатаз находится сигнальный пептид, 15-20 (ак) в основном состоящий из гидрофобных аминокислот и оканчивающийся сайтом Ala-Хаа-Ala (Arima *et al.*, 1983; Perlman, Halvorson, 1983; Payne *et al.*, 1995; Fermiñán, Domínguez, 1997). Эти черты характерны для большого количества сигнальных пептидов бактерий и эукариот (Halegoua, Inouye, 1979). Несмотря на то, что белки, слитые с сигнальным пептидом Pho5p *S. cerevisiae* секретируются в среду, сама кислая фосфатаза локализована в клеточной стенке и периплазме (Linnemans *et al.*, 1977; Hanes *et al.*, 1986). Также было показано, что Pho5p направляется в клеточную стенку даже в отсутствие сигнального пептида (Haguenauer-Tsapis *et al.*, 1986; Silve *et al.*, 1987), что может свидетельствовать о наличии других сигнальных последовательностей в этом белке, отвечающих за его секрецию и закрепление в клеточной стенке. Pho5p также потенциально может быть использован как якорный белок в виду его локализации в клеточной стенке.

Таким образом, дрожжевой дисплей является перспективным направлением для решения ряда задач, стоящих перед биотехнологией, клеточной инженерией и медициной.

Цель и задачи работы

Цель работы: поиск перспективных компонентов для создания систем дрожжевого дисплея рекомбинантных белков на основе *P. pastoris*

Задачи:

- Оценить эффективность существующих систем дрожжевого дисплея на основе белков Pir1 *S. cerevisiae* и *P. pastoris*
- Изучить локализацию кислых фосфатаз Pho5p *S. cerevisiae* и Pho1p *P. pastoris*, синтезируемых клетками *P. pastoris*
- Изучить возможности применения фрагментов кислой фосфатазы Pho5p для секреции и заякоривания рекомбинантных белков в клетках *P. pastoris*

Материалы и методы

Праймеры

Все праймеры, использованные в работе, перечислены в Таблице 1.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе.

Название	Последовательность (5' → 3')
ScPIR1-F	TTTCCTAGGAGAGCCGCTGCTATCTCTC
ScPIR1Short-R	TTTGCGGCCGCTTAAGAAGTTAAAGTTGTGGTTGG
ScPIR1Long-R	TTTGCGGCCGCTTAACAGTTGAGCAAATCGATAGC
PpPIR1-F	TTTCCTAGGGCCGACAAGATTAAGAGAGAG
PpPIR1Short-R	TTTGCGGCCGCTTACCCTTTATCCTCTGATGTGTC
PpPIR1Long-R	TTTGCGGCCGTTACTAACACTCTATGAGGTCTACAATGTC
EGFP-F	TTTGAATTCATGGTGAGCAAG
EGFP-R	TTTCCTAGGCTTGTACAGCTCGTC
EGFPoe-R	TTTGAATTCTTATTACTTGTACAGCTCGTC
EGFP-PHO5ssShort-F	CCAATGCAATGGTGAGCAAGG
EGFP-PHO5ssLong-F	CCAAAAAATGGTGAGCAAGG
PHO5ss-F	TTGGAGCTCGCTCATTCC
PHO5ssShort-EGFP-R	CTCACCATTGCATTGGCCAAAGAAGC
PHO5ssLong-EGFP-R	CTCACCATTTTTTGGGTACCAATCCTTGTCG
PHO5-1-EcoRI-F	AGAATTCTTAGCCGCTTCTTTGG
PHO5-2-BamHI-F	AGGATCCATGGGTACCATTCCCTTAGGC
PHO5-2-EcoRI-F	AGAATTCGGTACCATTCCCTTAG
PHO5-3-EcoRI-F	AGAATTCGATATCTTCCCATTTTTTGG
PHO5-EcoRI-R	CGAATTCCAAAACCTATTGTCTC
PHO5-1-R	AACGACAGCTTTTTGGGTACCAATCCTTGT

PHO5-2-R	AACGACAGCTTGAGCAGTGTCATGACATC
PHO5-3-R	AACGACAGCGGCATTGAACAAGTTGGA
PHO5-4-R	AACGACAGCTTGTCTCAATAGACTGGCGT
LacZ-1-F	CAAAAAGCTGTCGTTTTACAACGTCGTGA
LacZ-2-F	GCTCAAGCTGTCGTTTTACAACGTCGTGA
LacZ-3-F	CAATGCCGCTGTCGTTTTACAACGTCGTGA
LacZ-4-F	GAGACAAGCTGTCGTTTTACAACGTCGTGA
LacZ-R	CGAATTCTTATTTTTGACACCAGACCAAC
LacZ-F	AGGATCCATGGTCGTTTTACAACGTCGTGA

Плазмиды

В работе были использованы следующие плазмиды: pAL2-T (Евроген, Россия), pPIC9 (Thermo Fisher Scientific, США), pPIC9-AOX1-PHO5 (Савинов и др., 2009), pYG1B-EGFP, pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific, США), pCMV-LacZ (Clontech, США).

Штаммы

Таблица 2. Дрожжевые штаммы

Штамм	Генотип	Источник
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>his4</i>	Thermo Fisher Scientific, США
<i>S. cerevisiae</i> yIG397	<i>MATa ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 can1-100 ura3-1 URA3 3*RGC-pCYCI-ADE2</i>	Любезно предоставлен доктором R. Iggo

Таблица 3. Бактериальные штаммы

Штамм	Генотип
<i>Escherichia coli</i> DH-5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>

Среды и условия культивирования

Для культивирования штаммов дрожжей использовали следующие среды. Md (минимальная среда): 7.34 мМ KH_2PO_4 , 0.95 мМ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 мМ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9 мМ CaCl_2 , 1.7 мМ NaCl , 37.85 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; витамины, микроэлементы (400 мкл/мл 2500х раствора); 2% - глюкоза, 2.4% агар (если среда твёрдая), аминокислоты и азотистые основания (если необходимо): аденин, лейцин, урацил – 40 мг/л, триптофан, гистидин, треонин – 20 мг/л. MM: аналогично среде Md, но с добавлением метанола 1% вместо глюкозы. YEPD: 2% глюкоза, 2% пептон, 1% дрожжевой экстракт, 2.4% агар (если среда твёрдая) (Захаров, Кожин, Кожина, 1984). МФО: 2% глюкоза, 5 мл раствора солей (0.75 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.73 М $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 мМ CaCl_2), 20 мМ Na-цитратный буфер (pH 4.6), витамины, микроэлементы (400 мкл/мл 2500х раствора). BMGY/BMMY: 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 100 мМ K_3PO_4 (pH 6.0), 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ биотин, 1% глицерин / 0.5% метанол. Штаммы дрожжей *S. cerevisiae* и *P. pastoris* выращивали в термостате при температуре 30°C.

Для культивирования бактериальных штаммов использовали среды LB и TYM. LB: 1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 170 мМ NaCl , 2.4% агар (если среда твердая), антибиотики (если необходимо): бензилпенициллин - $5 \cdot 10^5$ е.а./л. TYM: 2% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 100 мМ NaCl , 10 мМ MgSO_4 . Штаммы *E. coli* выращивали в термостате при температуре 37°C.

Приготовление компетентных клеток *E. coli* (Hanahan, 1983)

Для приготовления компетентных клеток 1 мл стационарной культуры *E. coli* засеивали в 100 мл свежей среды TYM и выращивали в качалке при комнатной температуре до оптической плотности клеточной суспензии OD_{600} равной 0.4. Затем центрифугировали клетки при 5000 оборотах в минуту (об/мин) в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали в 2 мл охлажденного буфера TfB1. Клетки в буфере инкубировали 40 минут в ледяной бане. Затем клетки центрифугировали в течение 15 минут при 5000 об/мин. Получившийся осадок ресуспендировали в 2 мл охлажденного

буфера Tfb2. Полученную суспензию клеток разливали по пробиркам на 1.5 мл по 100 мкл. Полученные компетентные клетки хранили при -70°C. Tfb1: 15% глицерина, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl, 30 mM KAc, 50 mM MnCl₂. Tfb2: 15% глицерина, 10 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 10 mM MOPS.

Трансформация бактерий *E. coli* (Hanahan, 1983)

Для трансформации к 90 мкл суспензии компетентных клеток добавляли 10 мкл раствора ДНК. Полученную смесь инкубировали в ледяной бане в течение 30 минут. Затем пробу помещали на 30 секунд в водяной термостат, нагретый до 42°C, чтобы вызвать у бактерий тепловой шок. Для остановки теплового шока пробу охлаждали 15 секунд во льду. После этого в пробирку добавляли 900 мкл среды LB и инкубировали 1 час при 37°C. После инкубации пробирку центрифугировали 2 минуты при 7000 об/мин и сливали большую часть надосадочной жидкости. Ресуспендировали клетки в оставшемся объеме жидкости и высевали на среду LB с антибиотиком для отбора трансформантов.

Выделение хромосомной ДНК из дрожжей *P. pastoris* и *S. cerevisiae* (Guthrie, Fink, 1991)

Клетки дрожжей культивировали в 20 мл YEPD до OD₆₀₀ равной 0.5. Переносили 1 мл клеток в пробирку на 1.5 мл и центрифугировали при 7000 об/мин 2 минуты. Осадок промывали водой и ресуспендировали в 500 мкл буфера для выделения ДНК из дрожжей. К полученной суспензии добавляли 0.6 г стеклянных шариков диаметром 0.45 мм, промытых кислотой. Разрушали клетки с помощью дезинтегратора в течение 1 минуты и инкубировали 1 минуту при 0°C. Перемешивание и охлаждение повторяли 5 раз. Затем инкубировали 10 минут при температуре 70°C. После этого добавляли 150 мкл 5 M NaCl и 200 мкл 5 M KAc. Инкубировали 20 минут в ледяной бане при температуре 0°C. Центрифугировали при 13400 об/мин 20 минут. Отбирали верхнюю жидкую фазу в новую пробирку. Затем добавляли хлороформ в равном объеме, перемешивали, центрифугировали 5 минут при 13400 об/мин и снова отбирали верхнюю фазу в новую пробирку. После этого в эту же пробирку добавляли 3 M NaAc в объеме 1/15 от объема перенесенной в пробирку жидкости и EtOH 96% в двойном объеме и инкубировали ночь при температуре -20°C. После инкубации центрифугировали пробу 15 минут при 13400 об/мин, сливали надосадочную жидкость и добавляли 200 мкл EtOH 70%. Перемешивали и центрифугировали 15 минут при

13400 об/мин. Сливали надосадочную жидкость, а осадок хромосомной ДНК высушивали с помощью прибора Eppendorf Concentrator (Eppendorf, США). Высушенный осадок хромосомной ДНК растворяли в 20 - 40 мкл стерильной воды. Буфер для выделения ДНК из дрожжей: 50 mM трис-HCl (pH 7.5), 20 mM ЭДТА, 1% SDS.

Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя реактивов и ДНК-полимераз Encyclo (Евроген, Россия) в смеси объемом 30 мкл. Программы описаны в таблице 4.

Таблица 4. Программы ПЦР, используемые в работе.

Программа	1	2	3	4	5	Sequencing
Полимераза	Encyclo	Encyclo	Encyclo	Encyclo	Encyclo	BigDye Mix
Первичная денатурация (°C, с)	95, 180	95, 180	95, 180	95, 180	95, 180	95, 240
Денатурация (°C, с)	95, 30	95, 30	95, 30	95, 30	95, 30	95, 10
Отжиг праймеров (°C, с)	50, 30	50, 30	48, 30	48, 30	50, 30	50, 5
Элонгация (°C, с)	72, 60	72, 120	72, 60	72, 120	72, 210	60, 120
Количество циклов	30	30	30	30	30	25
Конечная элонгация (°C, мин)	72, 2	72, 2	72, 2	72, 2	72, 2	-

Трансформация дрожжей *P. pastoris* методом электропорации (Wu, Letchworth, 2004)

Переносили 1 мл суспензии клеток с оптической плотностью OD₆₀₀ от 0.6 до 1.0 в пробирку на 1.5 мл и центрифугировали при 7000 об/мин 2 минуты. Тщательно отбирали остатки среды и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Затем центрифугировали при 4°C 3 минуты при 7000 об/мин и отбирали супернатант. Добавляли 500 мкл 1 М сорбитола, центрифугировали при 4°C 3 минуты при 7000 об/мин и отбирали надосадочную жидкость. Отмывание 1 М сорбитолом повторяли 3 раза. В последний раз тщательно отбирали надосадочную жидкость. Затем добавляли 80 мкл 1 М сорбитола и раствор ДНК. Пробу перемешивали и заливали в кювету для электропорации. Затем подвергали кювету воздействию электрического поля с разницей потенциала 1600 В в течение 5 мс и сразу же добавляли в кювету 500 мкл холодного сорбитола. После этого добавляли 500 мкл жидкой среды YEPD, перемешивали и переносили в пробирки на 1.5 мл. Инкубировали 1 час при 30°C, центрифугировали 2 минуты при 7000 об/мин, удаляли большую часть надосадочной жидкости. Ресуспендировали клетки в оставшейся жидкости и высевали на чашки с селективной средой. Буфер для электропорации: 100 мМ LiAc, 10 мМ дитиотриетол, 0.6 М сорбитол, 10 мМ трис-HCl (pH 7.5).

Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование проводили с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 250 нг плазмидной ДНК, 1.6 мкл праймера для секвенирования, 1 мкл BigDye Terminator v3.1. Реакцию проводили по программе Sequencing (табл. 4).

Определение интенсивности флуоресценции белка EGFP

Штаммы с генами, кодирующим белок EGFP, проверяли на наличие флуоресценции с помощью микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Германия) в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Измерение флуоресценции проводили на микропланшетном флуориметре “Synergy2” (BioTek, США). При измерении флуоресценции EGFP использовали длину волны 485 нм (+/- 20) для возбуждения флуоресценции и длину волны 528 нм (+/- 20) для детекции. Удельную флуоресценцию EGFP определяли как отношение величины эмиссии света

клеточной суспензией при длине волны 528 нм к величине оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 600 нм.

Выделение белков мембраны и клеточной стенки

Общая часть протокола. 1.5 мл суспензии клеток центрифугировали 2 минуты при 7000 об/мин, отбирали супернатант, промывали клетки и растворяли в 500 мкл LY-1 буфера. Добавляли 0.6 г стеклянных шариков диаметром 0.45 мм, и разрушали клетки с помощью дезинтегратора при -4°C. Затем центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин.

Выделение мембранных белков. Отбирали 200 мкл супернатанта. Дважды добавляли в пробирку со стеклянными шариками 200 мкл LY-1 буфера, перемешивали и отбирали 200 мкл. Полученные 600 мкл супернатанта центрифугировали 1 минуту при 2000 об/мин. 500 мкл супернатанта переносили в новую пробирку и добавляли туда 75 мкл 10% Triton X-114. Полученную смесь инкубировали в ледяной бане 40 минут, центрифугировали 5 минут при 4°C и 10000 об/мин. Отбирали супернатант и инкубировали его 3 минуты при 33°C. Центрифугировали 20 сек при 10000 об/мин удаляли верхнюю (водную) фазу. Фазу детергента дважды промывали 200 мкл LY-1 буфера. Добавляли 500 мкл LY-3, 0.3 акт.ед. фосфолипазы C и инкубировали 3 часа при 37°C. Центрифугировали 20 сек при 10000 об/мин, удаляли водную фазу. Фазу детергента хранили при -20°C.

Выделение белков клеточной стенки. Удаляли супернатант и промывали шарики дважды 200 мкл LY-2 буфера. Центрифугировали 1 минуту при 10000 об/мин. Осадок дважды промывали 200 мкл горячего (95°C) LY-2 буфера и пять раз 100 мкл LM буфера. Добавляли 150 мкл LM буфера, 1 мг β -1,3-D-глюканазы и инкубировали 2 часа при 37°C. Центрифугировали 5 минут при 12000 об/мин. Супернатант - фракцию белков клеточной стенки - хранили при -20°C.

LY-1: 50 mM трис, 5 mM ЭДТА, 150 mM NaCl, Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem, США). LY-2: LY-1 с добавлением 2% SDS. LY-3: LY-1 без NaCl. LM: 100 mM NaAc (pH 5.5), 1 mM ЭДТА, Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem, США).

Белковый электрофорез в ПААГ

Для приготовления геля использовали следующие растворы. Концентрирующий гель 6%: 20% AL 25% DL, 1% ПСА, 0.1% ТЕМЕД. Разделяющий гель 17%: 47.8% AL,

25% BL, 0.1% ПСА, 0.1% ТЕМЕД. AL: 30% акриламид, 0.8% бисакриламид. BL (pH 8.8): 1.5 М трис-НСl. DL (pH 6.8): 0.5 М трис. Буфер для нанесения проб: 50 мМ трис-НСl, 100 мМ дитиотреитол, 2% SDS, 10% глицерин, 0.1% бромфеноловый синий. Для нанесения в гель брали 8 мкл пробы и 8 мкл красителя.

Вестерн-блоттинг

Инкубировали гель в ренатурирующем буфере в течение 10 минут, затем в буфере для переноса в течение 2 минут. Перенос осуществляли в течение 45 минут при напряжении 75 В. Мембрану инкубировали в течение ночи в буфере TBS-BSA при 25°C. Переносили мембрану в буфер TBS-BSA с первичными антителами и инкубировали 1.5 часа при 37°C. Промывали трижды TBS-BSA буфером по 5 минут. Инкубировали 1 час в TBS-BSA буфере с вторичными антителами. Трижды промывали 10 мМ трис-НСl (pH 8.0) по 5 минут. В 10 мл 10 мМ трис-НСl проводили окрашивание мембраны смесью 0.02% диаминобензидина в 10 мМ трис-НСl (pH 7.5) с 3% перекисью водорода. TBS-BSA: 10 мМ трис (pH 8.0), 150 мМ NaCl, 1% BSA. Ренатурирующий буфер: 4 М мочевины, 10 мМ трис-НСl, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ глицин 0.1 мМ дитиотриетол. Буфер для переноса (pH 8.3): 25 мМ трис-НСl, 190 мМ глицин, 20% метанол.

Качественное определение активности кислой фосфатазы

(Самсонова и др., 1975)

На поверхность среды с выросшими колониями дрожжей накладывали бумажные фильтры, смоченные раствором субстрата α -нафтилфосфата и красителя синего прочного Б в концентрациях 2 мг/мл 0.1 М цитратного буфера pH 4.6. Через 10-15 минут оценивали интенсивность окрашивания колоний дрожжей.

Количественное определение активности КФ

(Падкина и др., 1974)

К 800 мкл 0.1 М Na-цитратного буфера (pH 4.5) добавляли 100 мкл клеточной суспензии и 100 мкл 0.15 М паранитрофенилфосфата. Реакционную смесь перемешивали и инкубировали 20 минут при 30°C в термостате. Остановку реакции производили добавлением 500 мкл 1 М NaOH. Удельную активность кислой фосфатазы определяли как отношение величины поглощения света реакционной

смесью при длине волны 410 нм к величине оптической плотности исходной клеточной суспензии при длине волны 600 нм.

Количественное определение активности β -галактозидазы

Центрифугировали 1 мл культуры 3 минуты при 7000 об/мин. Отбирали среду, промывали клетки водой и центрифугировали еще 3 минуты при 7000 об/мин. После этого добавляли 500 мкл буфера для лизиса клеток и 0.6 г стеклянных шариков. Разрушение клеток проводили с помощью дезинтегратора в течение 5 минут при 0°C. Центрифугировали 3 минуты при 13400 об/мин. 100 мкл супернатанта добавляли к 900 мкл Z-буфера. Полученную смесь инкубировали 10 минут при 30°C, затем добавляли 200 мкл раствора ONPG. По истечении 10 минут остановку реакции проводили добавлением 500 мкл 1 М Na₂CO₃. Удельную активность β -галактозидазы определяли как отношение величины поглощения света реакционной смесью при длине волны 420 нм к величине оптической плотности исходной клеточной суспензии при длине волны 600 нм. Z-буфер: 40 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 60 mM NaH₂PO₄·H₂O, 10 mM KCl, 1mM MgSO₄·7H₂O, 50 mM 2-меркаптоэтанол. Раствор ONPG: 4 мг/мл в Z-буфере. Буфер для лизиса клеток: 50 mM Трис-HCl, 10 mM ЭДТА.

Сравнение аминокислотных последовательностей белков Pho1

P. pastoris* и Pho5 *S. cerevisiae

Последовательности для сравнения были взяты из базы UniprotKB. Идентификаторы в базе данных - P52291 для Pho1p *P. pastoris* и P00635 для Pho5p *S. cerevisiae*. Выравнивание проводилось с помощью алгоритма BLASTP 2.8.0+, со стандартными параметрами (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005).

Молекулярные методы

Гидролиз ДНК производили в буферах и при условиях, предложенных фирмой-производителем фермента (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Дефосфорилирование вектора производили с помощью фосфатазы FastAP (Thermo Fisher Scientific Inc., США) одновременно с гидролизом ДНК эндонуклеазами рестрикции. Очистка ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей проводилась с помощью наборов Cleanup Standard (Евроген, Россия). Лигирование фрагментов ДНК проводили с помощью T4

ДНК лигазы (Евроген, Россия) при условиях, рекомендованных фирмой-изготовителем фермента.

Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 0.7% агарозном геле в буфере ТАЕ. Для окрашивания препаратов ДНК добавляли 6 мкл раствора бромистого этидия на 100 мл геля. Электрофорез проводили при напряжённости поля 6-7 В/м (Остерман, 1981). ТАЕ: 40 mM трис, 40 mM ледяная уксусная кислота, 0.5 M ЭДТА (pH 8.0).

Для скрининга колоний *E. coli* методом ПЦР небольшое количество клеток из колонии на кончике стерильной зубочистки переносили в пробирку, содержащую 10 мкл дистиллированной воды. Для ПЦР брали 1 мкл получившейся суспензии клеток. Для лизиса клеток увеличивали время первичной денатурации до 7 минут. Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью наборов Plasmid Miniprep (Евроген, Россия).

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с помощью пакета ggpubr версии 0.1.6 языка программирования R версии 3.4.4 (Kassambara, 2017; R Core Team, 2018). Сравнение выборок проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни.

Результаты

Конструирование штаммов, использующих Pir1p *P. pastoris* и *S. cerevisiae*, в качестве якорного белка

На первом этапе работы для получения конструкций, позволяющих проводить дрожжевой дисплей в *P. pastoris*, были применены известные якорные белки. Для этого были использованы последовательности белков Pir1, эффективно применяемые в дрожжах *S. cerevisiae* и перспективные для применения в дрожжах *P. pastoris*. С помощью ПЦР были синтезированы фрагменты генов *PIR1* *S. cerevisiae* и *P. pastoris*, а также EGFP. ПЦР для наработки фрагментов *PIR1* *S. cerevisiae* (табл. 4, прог. 1) проводили с парами праймеров ScPIR1-F - ScPIR1Short-R, ScPIR1-F - ScPIR1Long-R для короткого и длинного вариантов гена соответственно, в качестве матрицы была использована хромосомная ДНК штамма yIG397 *S. cerevisiae*. Аналогичные ПЦР (табл. 4, прог. 1) были проведены с праймерами PpPIR1-F - PpPIR1Short-R, PpPIR1-F - PpPIR1Long-R с хромосомной ДНК штамма GS115 *P. pastoris* в качестве матрицы. Последовательность гена EGFP была получена с помощью ПЦР по плазмиде pYG1B-EGFP с праймерами EGFP-F - EGFP-R (табл. 4, прог. 1). Полученные фрагменты были встроены в плазмиду pAL2-T. Плазмиды были проверены с использованием ПЦР и рестрикционного анализа (рис. 4).

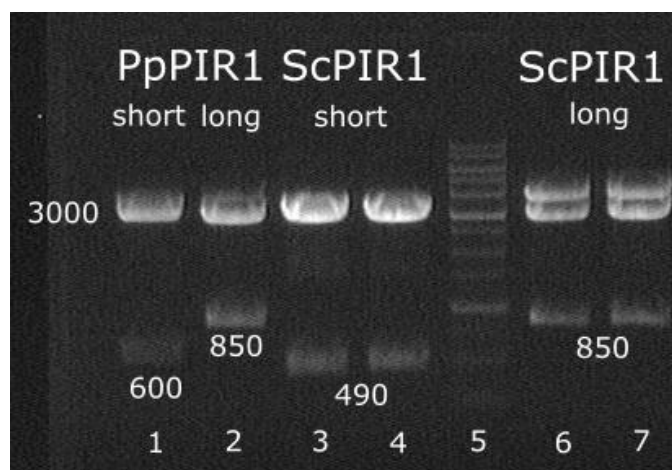


Рисунок 4. Рестрикционный анализ плазмид pAL2-T, обработанных рестриктазами *AvrII-NotI* со следующими вставками: дорожка 1 - PpPIR1Short, 2 - PpPIR1Long, 3 и 4 - ScPIR1Short, 6 и 7 ScPIR1Long. 5 дорожка - ДНК-маркер (Евроген, 1kb).

На следующем этапе фрагмент гена EGFP был встроен в плазмиду pPIC9 по сайтам *AvrII-EcoRI*. В полученную плазмиду pPIC9-EGFP были встроены фрагменты генов *PIR1* по сайтам рестрикции *AvrII-NotI*. Наличие необходимых конструкций в плазмиде pPIC9 было подтверждено методом ПЦР (рис. 5), и с помощью секвенирования методом Сэнгера было показано, что оба гена находятся в одной рамке считывания.

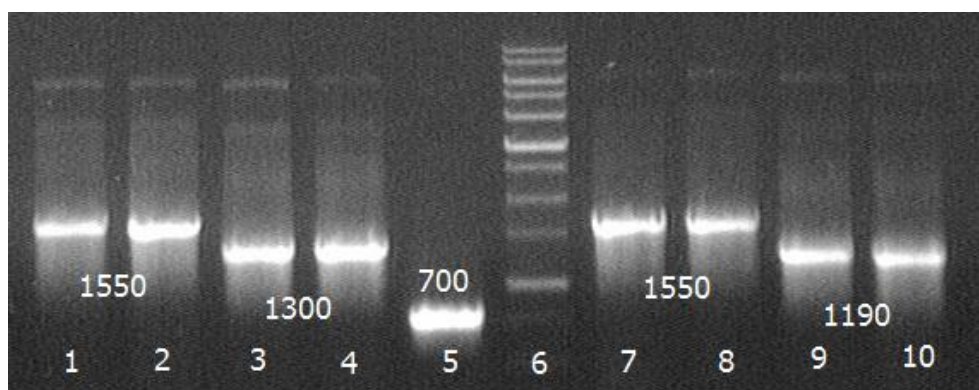


Рисунок 5. Электрофорез продуктов ПЦР. Дорожки: 1 и 2 - плазмиды pPIC9-PpPIR1Long-EGFP, 3 и 4 - плазмиды pPIC9-PpPIR1Short-EGFP, 5 - плазмиды pAL2-T-EGFP (положительный контроль), 6 - ДНК-маркер (Евроген, 1kb), 7 и 8 - плазмиды pPIC9-ScPIR1Long-EGFP, 9 и 10 - плазмиды pPIC9-ScPIR1Short-EGFP.

Плазмиды линейаризовали по сайтам *StuI* и трансформировали ими штамм *P. pastoris* GS115 методом электропорации. Интеграция плазмиды происходила в локус *HIS4*. Полученные штаммы были проверены на наличие конструкции методом ПЦР с хромосомной ДНК в качестве матрицы.

Конструирование штаммов, использующих сигнальную последовательность Pho5p *S. cerevisiae*

Для экспонирования белков на поверхности клеток, необходима не только заякоривающая последовательность, но и сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию белка. Разнообразие сигнальных последовательностей позволяет расширить возможности синтеза рекомбинантных белков в *P. pastoris*. Ранее в нашей лаборатории было показано, что сигнальная последовательность Pho5p *S. cerevisiae* обеспечивает эффективную секрецию кислой фосфатазы в дрожжах *P. pastoris* (Савинов и др., 2009).

Поэтому на следующем этапе исследования была изучена работа сигнальной последовательности белка Pho5 *S. cerevisiae* в *P. pastoris*. Для этого методом ПЦР с

плазмидой pPIC9-AOX1-PHO5 в качестве матрицы синтезировали сигнальную последовательность гена *PHO5* с участком промотора *AOX1*. Для синтеза длинной (105 п.о.) и короткой (51 п.о.) сигнальных последовательностей использовали пары праймеров PHO5ss-F - PHO5ssShort-EGFP-R и PHO5ss-F - PHO5ssLong-EGFP-R соответственно (табл. 4, прог. 3). Последовательность гена EGFP была получена методом ПЦР с использованием праймеров EGFP-PHO5ssShort-F - EGFPoe-R и плазмиды pYG1B-EGFP в качестве матрицы (табл. 4, прог. 3). Синтезированные фрагменты генов имели искусственно введенные взаимно перекрывающиеся участки. Используя ПЦР с перекрывающимися праймерами, были получены последовательности PHO5ss-EGFP, с разной длиной сигнальной последовательности (табл. 4, прог. 3). Полученные фрагменты были встроены в плазмиду pPIC9 по сайтам рестрикции *SacI-EcoRI*. Наличие вставки в плазмиде было подтверждено с помощью ПЦР (рис. 6)

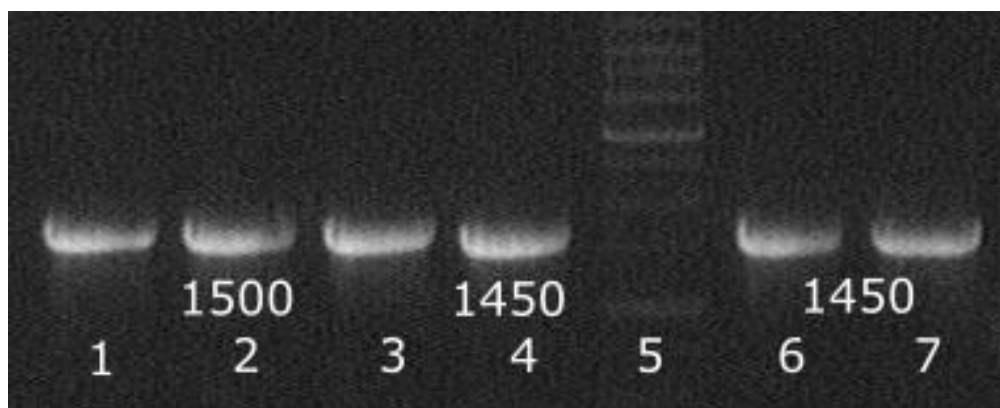


Рисунок 6. Электрофорез продуктов ПЦР с праймерами PHO5ss-F - EGFP-R. Дорожки: 1, 2 и 3 - плаزمида pPIC9-PHO5ssLong-EGFP; 4, 6, 7 - плазмида pPIC9-PHO5ssShort-EGFP; 5 - ДНК-маркер (Евроген, 1kb).

Сконструированные плазмиды линеаризовали рестриктазой *StuI* и полученной смесью трансформировали штамм GS115. Интеграцию плазмиды в хромосомную ДНК штамма подтвердили методом ПЦР (табл. 4, прог. 4). Результаты представлены на рисунке 7.

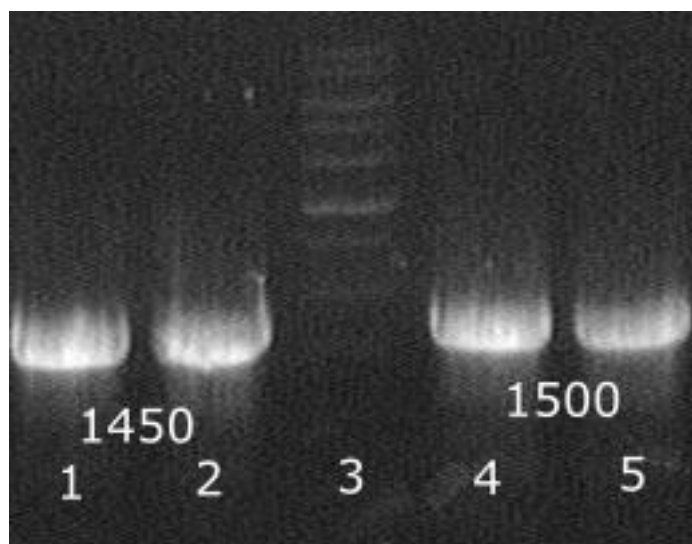


Рисунок 7. Электрофорез продуктов ПЦР с праймерами PHO5ss-F - EGFP-R. Дорожки: 1 и 2 - хр. ДНК штамма GS115, трансформированного плазмидой pPIC9-PHO5ssShort-EGFP; 4 и 5 - хр. ДНК штамма GS115, трансформированного плазмидой pPIC9-PHO5ssLong-EGFP; 3 - ДНК-маркер (Евроген, 1kb).

Таким образом были получены штаммы, перечисленные в таблице 5.

Таблица 5. Сконструированные штаммы.

Штамм	Якорный белок/Сигнальная последовательность
GS115-ScPIR1-1	<i>S. cerevisiae</i> PIR1 (61 -342 ак)
GS115-ScPIR1-2	<i>S. cerevisiae</i> PIR1 (61 -220 ак)
GS115-PpPIR1-1	<i>P. pastoris</i> PIR1 (54-292 ак)
GS115-PpPIR1-2	<i>P. pastoris</i> PIR1 (54-187 ак)
GS115-ScPHO5ss-1	<i>S. cerevisiae</i> PHO5 (1-35 ак)
GS115-ScPHO5ss-2	<i>S. cerevisiae</i> PHO5 (1-17 ак)

Изучение эффективности систем дрожжевого дисплея на основе белков Pir1

Полученные штаммы (табл. 5) культивировали в среде BMGY в течение 48 часов, после чего центрифугировали и переносили клетки в среду BMMY на 40 часов для индукции промотора *AOX1* и синтеза флуоресцентного белка. Качественная оценка флуоресценции клеток была проведена с помощью флуоресцентного микроскопа. Результаты микроскопии представлены на рисунке 8.

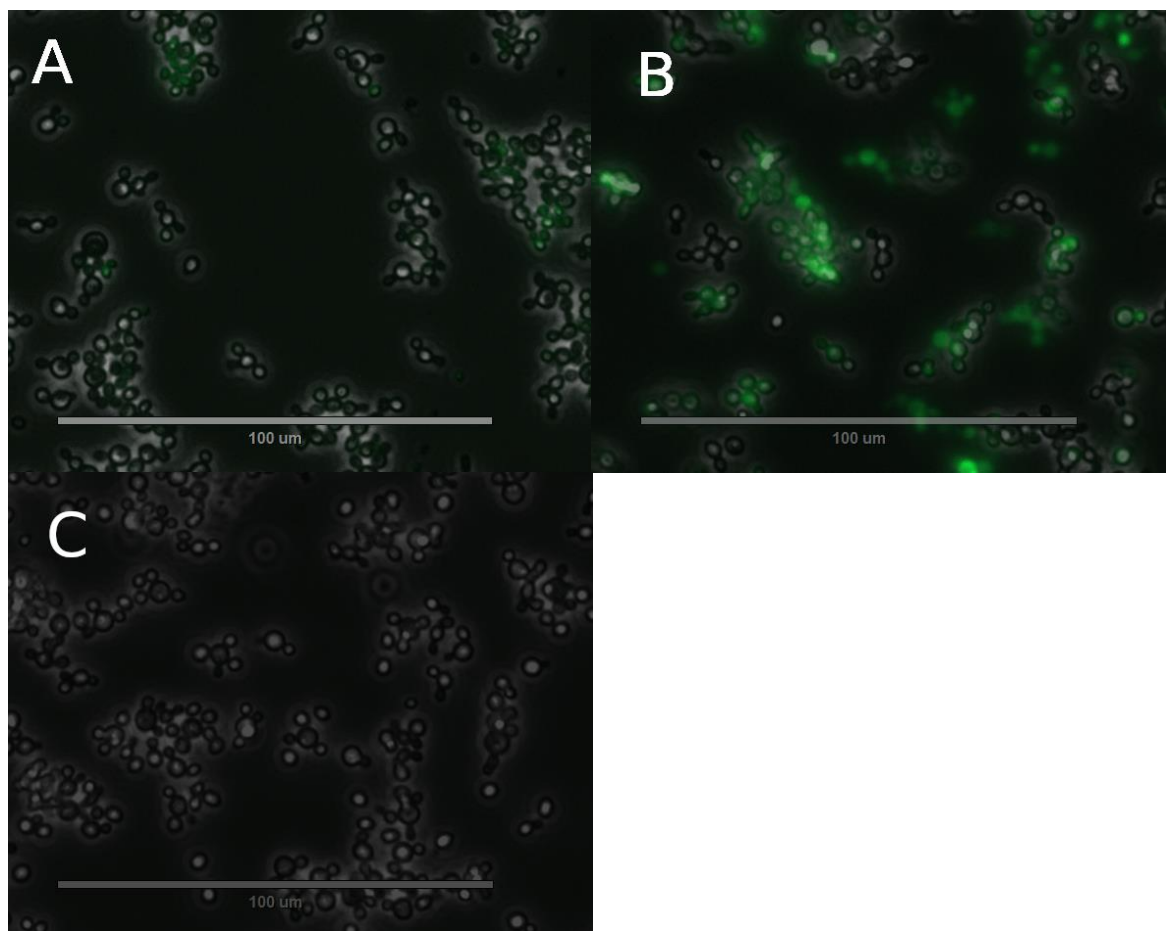


Рисунок 8. Флуоресценция клеток штаммов: А - GS115-ScPIR1-2, В - GS115-PHO5ss-1, С - GS115 (Отрицательный контроль).

Также были проведены измерения флуоресценции EGFP с помощью спектрофлуориметра. Результаты измерений, произведенных для штаммов GS115-ScPIR1-2 и GS115-PHO5ss-1, представлены на рисунке 6. На измерение флуоресценции брали 5 повторностей. Удельную флуоресценцию рассчитывали как отношение единиц флуоресценции к оптической плотности культуры, измеренной при длине волны 600 нм.

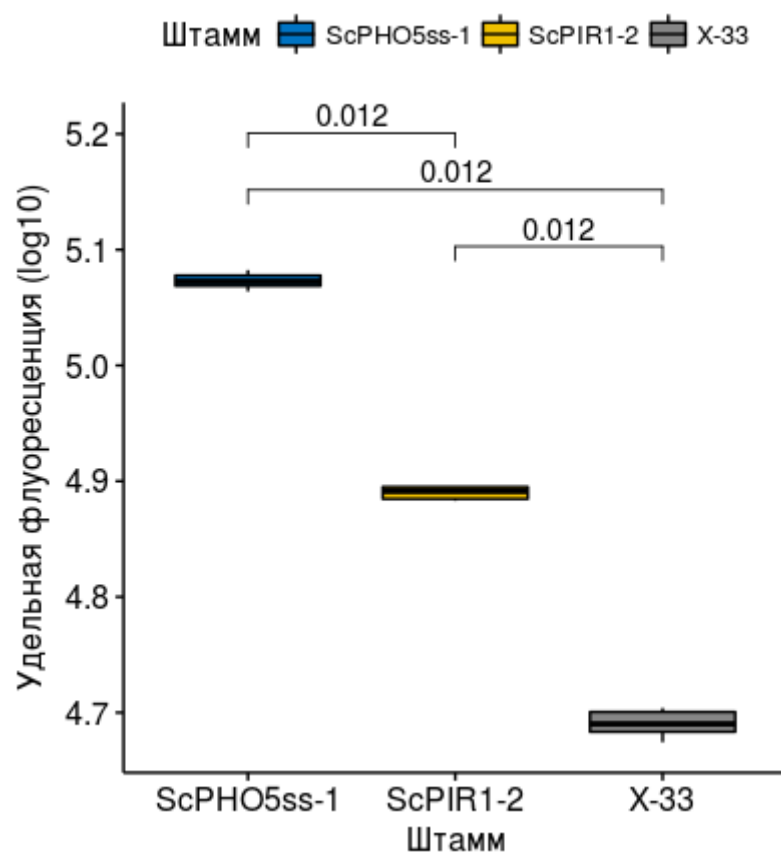


Рисунок 9. Удельная флуоресценция культур *P. pastoris* штаммов ScPHO5ss-1, ScPIR1-2, X-33 (отрицательный контроль).

Как видно на рисунке 9, клетки штамма GS115-ScPIR1-2 флуоресцируют слабее клеток штамма GS115-PHO5ss-1. Это свидетельствует о том, что добавление к белку EGFP якорного белка Pir1 *S. cerevisiae* снижает эффективность его синтеза. Ни с помощью микроскопии, ни с помощью спектрофлуориметра не было выявлено флуоресценции клеток штаммов GS115-ScPIR1-1, GS115-PpPIR1-1 и GS115-PpPIR1-2. Данные эксперименты проводили, по схеме, представленной в работах (Wang *et al.*, 2008; Khasa *et al.*, 2011b). Результаты этих исследований, однако, не воспроизводятся - присоединение фрагментов белков ScPIR1-1, ScPIR1-2 и PpPIR1-2 препятствует синтезу функционального белка EGFP.

Поиск новых якорных последовательностей

На следующем этапе работы был проведен поиск новых якорных белков для использования в дрожжевом дисплее с помощью *P. pastoris*. В качестве кандидата был выбран Pho5p *S. cerevisiae*. Из данных литературы известно, что Pho5p у *S. cerevisiae* располагается на поверхности клеток, что позволяет предположить существование в этом белке якорного домена (Linnemans *et al.*, 1977).

Для того, чтобы исследовать локализацию белка Pho5p, синтезируемого в клетках *P. pastoris* использовали штамм GS115-pAOX1-PHO5, содержащий последовательность гена *PHO5* *S. cerevisiae* под контролем промотора гена алкогольоксидазы 1 (*AOX1*) *P. pastoris*. GS115-pAOX1-PHO5 и контрольный штамм дикого типа X-33 культивировали в среде MM, содержащей метанол, в течение 40 часов. Активность кислой фосфатазы измеряли отдельно в культуральной среде и на поверхности клеток *P. pastoris* (рис. 10). Для этого центрифугировали 1 мл культуры и отбирали 100 мкл среды на измерение активности. Удаляли оставшуюся среду и разводили клетки в 1 мл воды. 100 мкл полученной суспензии брали на измерение активности. Измерения проводили в 5 повторностях. Удельную активность КФ рассчитывали, как отношение измеренной активности к плотности культуры, измеренной при длине волны 600 нм.

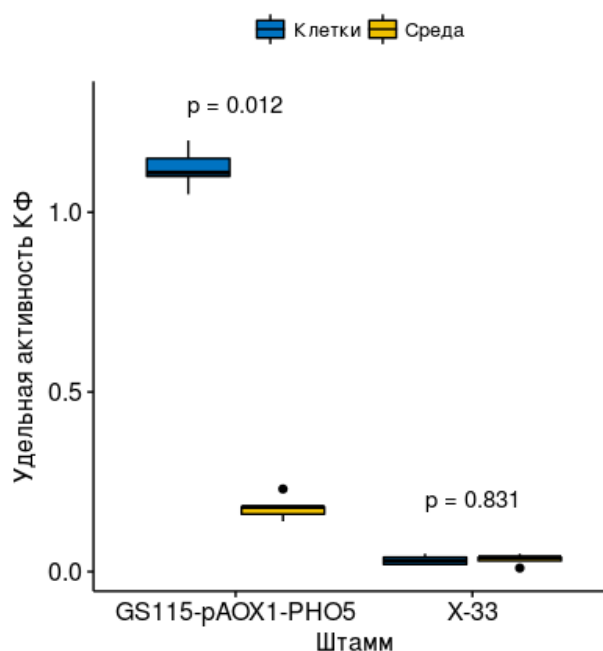


Рисунок 10. Удельная активность кислой фосфатазы Pho5p, синтезируемой штаммами дрожжей *P. pastoris* GS115-pAOX1-PHO5 и X-33, на поверхности клеток и в культуральной среде.

Из результатов измерений видно, что Pho5p в клетках *P. pastoris* также преимущественно располагается на поверхности клеток.

Сравнение кислых фосфатаз Pho5p *S. cerevisiae* и Pho1p *P. pastoris*

Дрожжи *P. pastoris* имеют собственную репрессибельную кислую фосфатазу Pho1p. Ее последовательность идентична последовательности Pho5p на 33% по результатам BLASTP (E-value: $4e-71$), 54% аминокислот при этом схожи или одинаковы по своим свойствам. Для изучения локализации Pho1p, штамм GS115 культивировали в течение 24 часов в среде МФО с добавлением гистидина и высокой концентрацией фосфата (1 г/л), репрессировавшей экспрессию *PHO1*. Затем культуры центрифугировали и переносили клетки в среду МФО с добавлением гистидина и низким содержанием фосфата (30 мг/л) и инкубировали в течение 40 часов. Активность кислой фосфатазы Pho1p измеряли в культуре, культуральной среде и на поверхности клеток (рис. 11). Измерения проводили в 7 повторностях

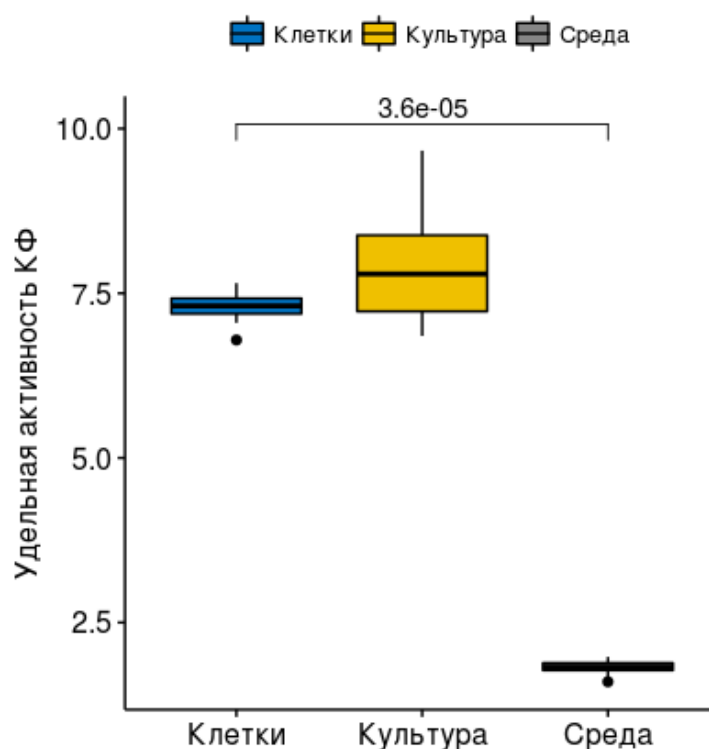


Рисунок 11. Удельная активность кислой фосфатазы Pho1p, синтезируемой штаммом GS115 *P. pastoris*.

По результатам измерений видно, что, как и в случае Pho5p *S. cerevisiae*, большая часть Pho1p локализуется на поверхности клеток.

Однако, в связи с тем, что белок Pho5p изучен в большей степени, исследование сигнальной последовательности и поиск якорного домена начали именно с него.

Изучение сигнальной последовательности Pho5p

Для того, чтобы определить домены Pho5p, участвующие в закреплении белка на поверхности клеток, сначала исследовали сигнальную последовательность. Для этого культивировали штамм GS115-ScPHO5ss-1, полученный на первом этапе работы, в среде ВММУ в течение 40 часов. При этом происходил синтез и секреция EGFP за счет активации промотора *AOX1* метанолом. Для определения локализации EGFP были выделены внутриклеточные белки, белки клеточной стенки, белки мембраны, а также белки среды и проведен Вестерн-блоттинг с антителами к EGFP (рис. 12).

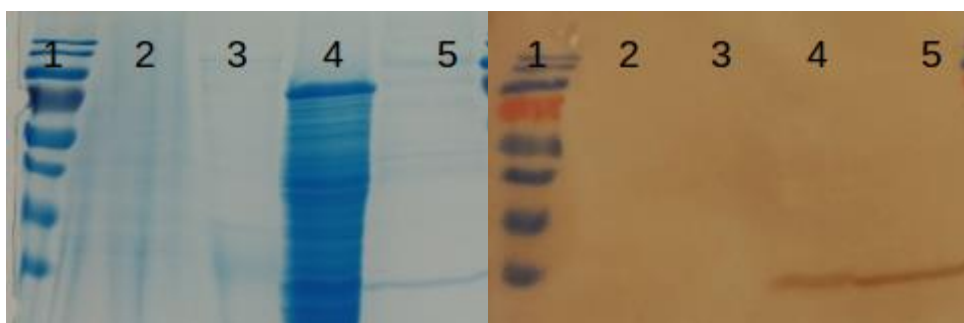


Рисунок 12. Анализ белков различных фракций клеток штамма GS115-ScPHO5ss-1. Слева - окрашивание Кумасси, справа - Вестерн-блоттинг с антителами к EGFP. 1 - маркер молекулярной массы (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, США), 2 - мембранные белки, 3 - белки клеточной стенки, 4 - внутриклеточные белки, 5 - белки среды.

На рисунке 12 видно наличие EGFP во фракции внутриклеточных белков и белков среды, но отсутствие во фракциях белков мембраны и клеточной стенки. Это говорит о том, что сигнальная последовательность белка Pho5p *S. cerevisiae* работает как фактор секреции в *P. pastoris*. Также было показано, что размер белка EGFP, секретируемого штаммом GS115-ScPHO5ss-1, где его последовательность исходно слита с сигнальной последовательностью Pho5p, совпадает с размером нативного EGFP, что свидетельствует об отрезании сигнальной последовательности (рис. 13).

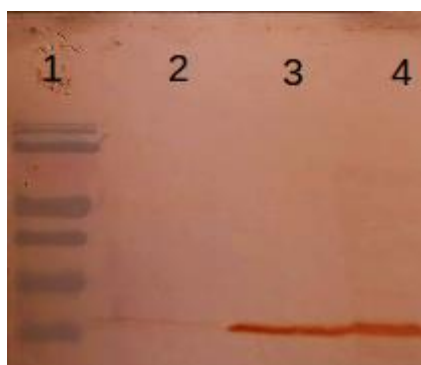


Рисунок 13. Вестерн-блоттинг с антителами к EGFP. 1 - маркер молекулярной массы (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, США), 2 - лизат клеток растений, синтезирующих EGFP, 3 - белки культивационной среды штамма GS115-PHO5ss-1, 4 - внутриклеточные белки штамма GS115-PHO5ss-1.

Поиск домена, отвечающего за закрепление белка Pho5 на поверхности клетки

Для поиска домена Pho5p, участвующего в заякоривании белка на поверхности клетки, были сконструированы плазмиды содержащие фрагменты гена *PHO5*, кодирующие укороченные с N-конца (лишенные сигнальной последовательности) варианты белка Pho5p. Фрагменты гена *PHO5* находились под контролем промотора AOX1, а в качестве сигнала секреции выступала сигнальная последовательность α -фактора. Фрагменты *PHO5* были наработаны методом ПЦР с парами праймеров PHO5-1-EcoRI-F - PHO5-EcoRI-R, PHO5-2-EcoRI-F - PHO5-EcoRI-R, PHO5-3-EcoRI-F - PHO5-EcoRI-R и плазмидой pPIC9-AOX1-PHO5 в качестве матрицы и встроены в промежуточную плазмиду pJET1.2. Затем фрагменты были перенесены в целевую плазмиду pPIC9 за счет рестрикции и лигирования по сайтам *EcoRI*. Сконструированные плазмиды линеаризовали рестриктазой *StuI* и полученной смесью трансформировали штамм GS115. Полученные штаммы перечислены в таблице 6.

Таблица 6. Сконструированные штаммы.

Штамм	Синтезируемый фрагмент Pho5p
GS115-pAOX1- α MF-PHO5-1	10-467 ак
GS115-pAOX1- α MF-PHO5-2	18-467 ак
GS115-pAOX1- α MF-PHO5-3	36-467 ак

Штаммы (табл. 6) культивировали в течение 40 часов в среде ММ, содержащей метанол, с целью индукции синтеза фрагментов кислой фосфатазы Pho5p для количественной оценки ее активности (рис. 14). Штаммы GS115-pAOX1-PHO5 и X-33 использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. Измерения проводили в 5 повторностях.

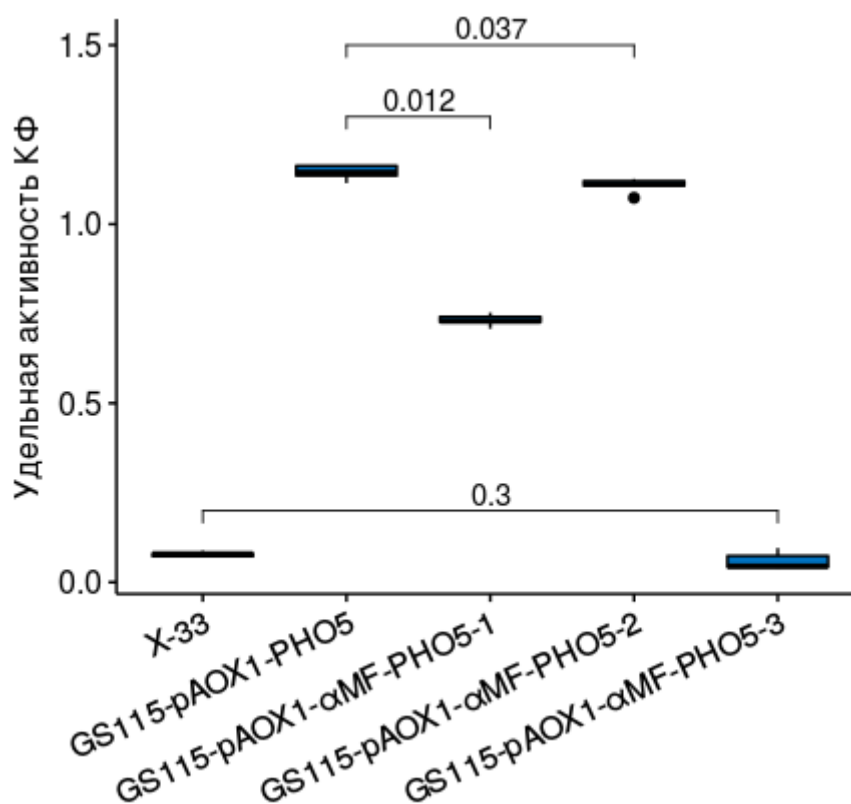


Рисунок 14. Удельная активность КФ на поверхности клеток штаммов: GS115-pAOX1-αMF-PHO5-1, GS115-pAOX1-αMF-PHO5-2, GS115-pAOX1-αMF-PHO5-3, X-33 и GS115-pAOX1-PHO5.

Из полученных данных следует, что неполное удаление сигнальной последовательности снижает уровень синтеза функционального белка Pho5. Замена собственной сигнальной последовательности Pho5p на сигнальную последовательность α-фактора приводит к небольшому снижению активности кислой фосфатазы на поверхности клеток. Это может быть связано с повышением уровня секреции КФ в среду (рис. 15). Дальнейшее укорочение кислой фосфатазы Pho5p с N-конца приводит к потере ее активности.

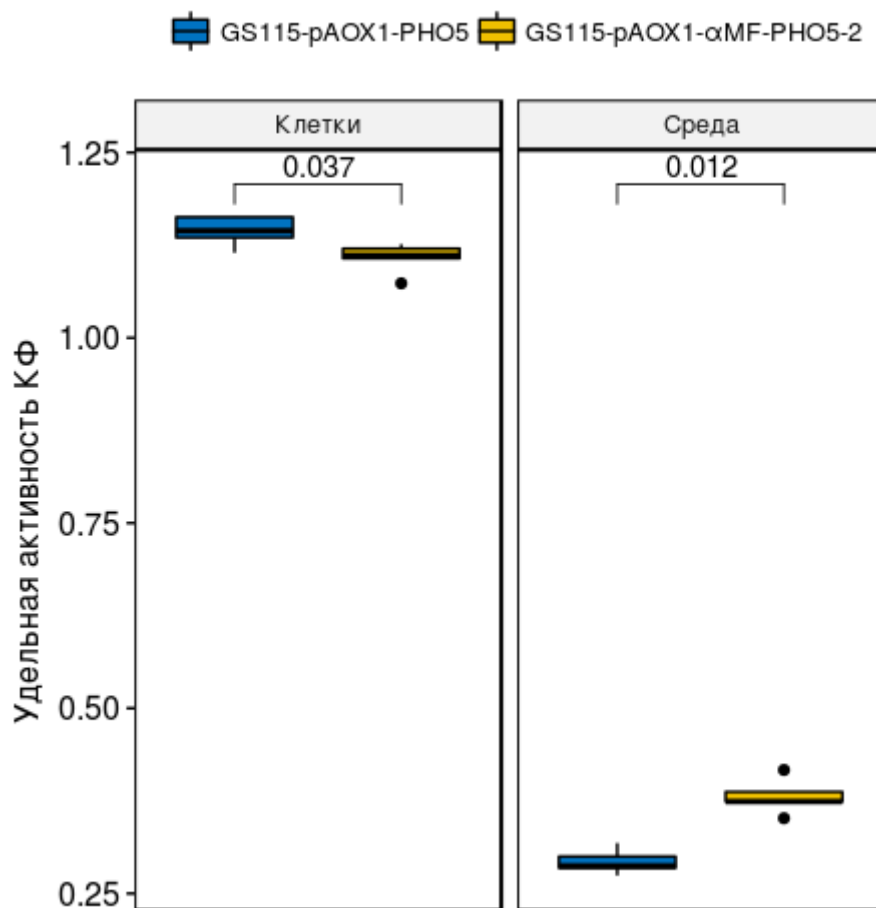


Рисунок 15. Удельная активность КФ на поверхности клеток штаммов - GS115-pAOX1-αMF-PHO5-2 и GS115-pAOX1-PHO5, и в культуральной среде.

Также был сконструирован штамм GS115-pAOX1-PHO5-2, содержащий фрагмент *PHO5* средней длины (18-647 ак) под контролем промотора *AOX1* без сигнальной последовательности альфа-фактора. Синтезируемый этим штаммом белок Pho5p должен быть внутриклеточным. Штаммы GS115-pAOX1-PHO5-2 и GS115-pAOX1-αMF-PHO5-2 культивировали в течение 40 часов в среде MM, содержащей метанол, с целью индукции синтеза фрагментов Pho5p для количественной оценки ее активности (рис. 16). Штамм X-33 использовали в качестве отрицательного контроля. Так как белок Pho5 в штамме GS115-pAOX1-PHO5-2 является внутриклеточным, активность Pho5p измеряли в лизатах клеток. Измерения проводили в 5 повторностях.

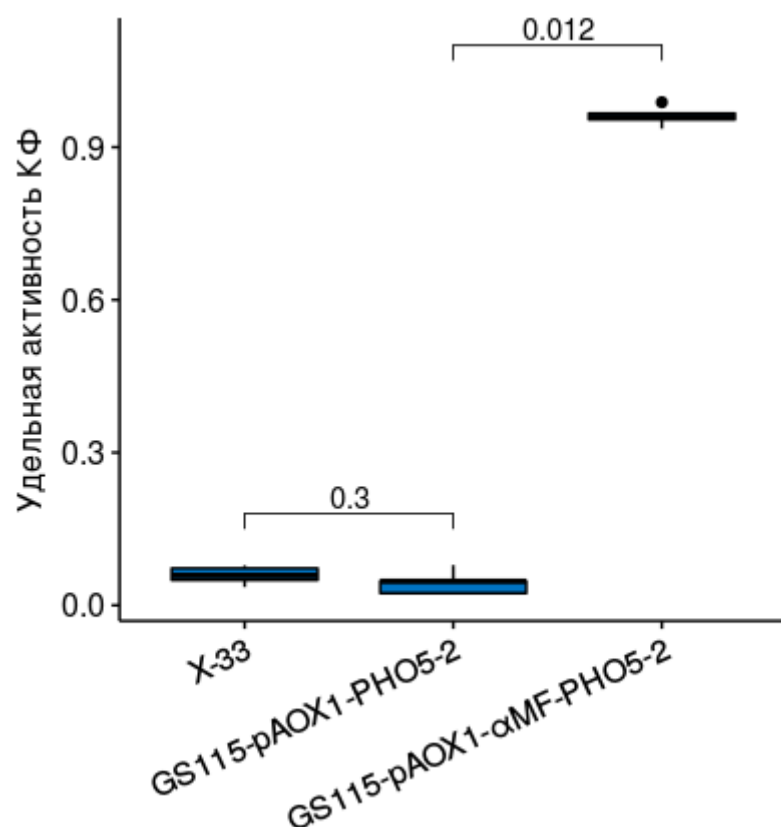


Рисунок 16. Удельная активность КФ лизатов клеток штаммов, синтезирующих экстраклеточный (GS115-pAOX1-αMF-PHO5-2) и внутриклеточный (GS115-pAOX1-PHO5-2) варианты Pho5p. X-33 - отрицательный контроль.

Штамм GS115-pAOX1-PHO5-2, отличающийся от штамма GS115-pAOX1-αMF-PHO5-2 только отсутствием сигнальной последовательности α-фактора перед последовательностью *PHO5*, не продуцирует активную КФ. Исходя из полученных результатов можно предположить, что либо собственная сигнальная последовательность, как в случае штамма GS115-pAOX1-PHO5, либо сигнальная последовательность α-фактора, как в случае штамма GS115-pAOX1-αMF-PHO5-2, необходима для правильного процессинга Pho5p.

Так как укорочение белка Pho5p с N-конца приводит к синтезу неактивных форм КФ, было решено проводить укорочение белка с С-конца и дополнительно использовать β-галактозидазу в качестве репортерного белка. Были получены химерные конструкции *PHO5-lacZ* с различными вариантами последовательности *PHO5*, укороченными с 3'-конца. Для этого методом ПЦР с парами праймеров *PHO5ss-F* - *PHO5-1-R*, *PHO5-F* - *PHO5-2-R/PHO5-3-R/PHO5-4-R* были наработаны фрагменты гена *PHO5* разной длины и с парами праймеров *LacZ-1-F/LacZ-2-F/LacZ-3-F/LacZ-4-F* -

LacZ-R - ген *lacZ* *E. coli* (табл. 4, прог. 5). В качестве матрицы для первой ПЦР выступала плазмида pPIC9-AOX1-PHO5, для второй ПЦР - плазмида pCMV-LacZ. С полученными фрагментами были проведены ПЦР с перекрыванием праймеров (табл. 4, прог. 5). Схемы синтезированных фрагментов представлены на рисунке 17.

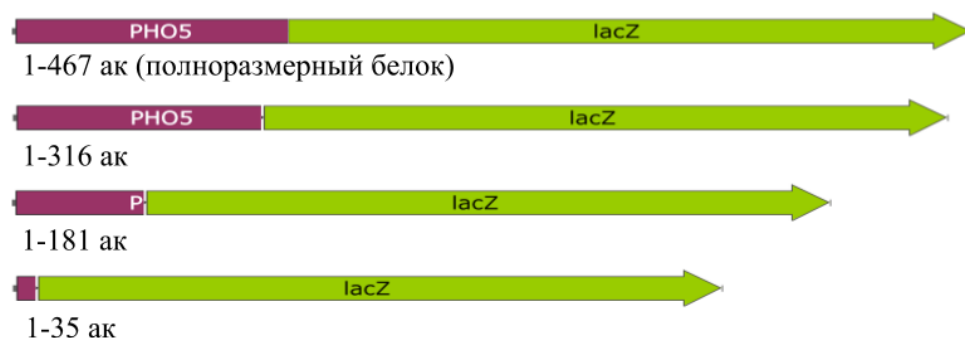


Рисунок 17. Варианты химерных белков, синтезирующихся с последовательностей, содержащих фрагменты гена *PHO5* и гена репортерного белка *LacZ*.

Полученные фрагменты были встроены в плазмиду pPIC9 по сайтам рестрикции *BamHI-EcoRI* и эти плазмиды были использованы для трансформации штамма GS115. Интеграцию плазмиды в хромосомную ДНК штамма подтвердили методом ПЦР (табл. 4, прог. 5) с праймерами LacZ-F - LacZ-R (рис. 18).

Также был получен контрольный штамм GS115-pAOX1-lacZ, синтезирующий внутриклеточную β -галактозидазу. Для этого методом ПЦР с плазмидой pCMV-LacZ в качестве матрицы была синтезирована последовательность гена *lacZ* и клонирована в плазмиду pPIC9 по сайтам рестрикции *BamHI-EcoRI*. Сконструированная плазмида была использована для трансформации штамма GS115.

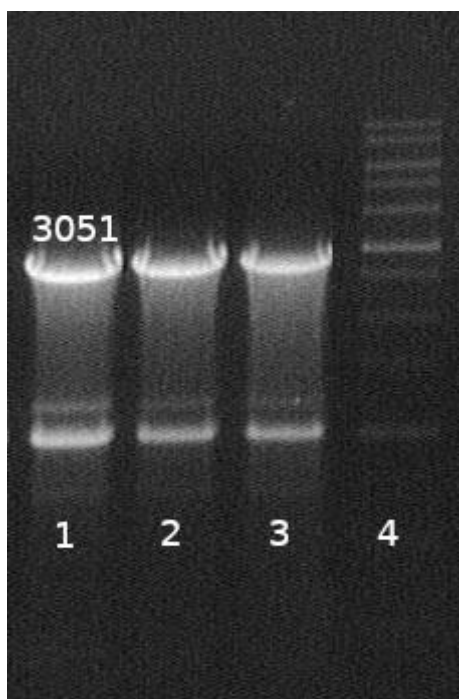


Рисунок 18. Электрофорез продуктов ПЦР с праймерами LacZ-F - LacZ-R по хромосомной ДНК штаммов GS115-pAOX1-PHO5-1-lacZ (1 дорожка), GS115-pAOX1-PHO5-3-lacZ (2 дорожка), 3- GS115-pAOX1-PHO5-4-lacZ (3 дорожка). 4 дорожка - ДНК-маркер (Евроген, 1kb).

Таблица 7. Сконструированные штаммы.

Штамм	Синтезируемый фрагмент Pho5p
GS115-pAOX1-PHO5-1-lacZ	1-35 ак
GS115-pAOX1-PHO5-2-lacZ	1-181 ак
GS115-pAOX1-PHO5-3-lacZ	1-316 ак
GS115-pAOX1-PHO5-4-lacZ	1-467 ак
GS115-pAOX1-lacZ	-

Сконструированные штаммы (табл. 7) с интеграцией фрагментов PHO5-LacZ под контролем промотора *AOX1*, были высеяны на среды, содержащие метанол, ММ и ММ с добавлением X-Gal. Ни один из 4 штаммов на среде с добавлением X-Gal не проявлял активности LacZ на поверхности колоний. Качественная оценка активности КФ на среде с метанолом выявила слабую активность КФ только у штамма GS115-pAOX1-PHO5-4-lacZ, синтезирующего полноразмерный белок Pho5 (рис. 19).

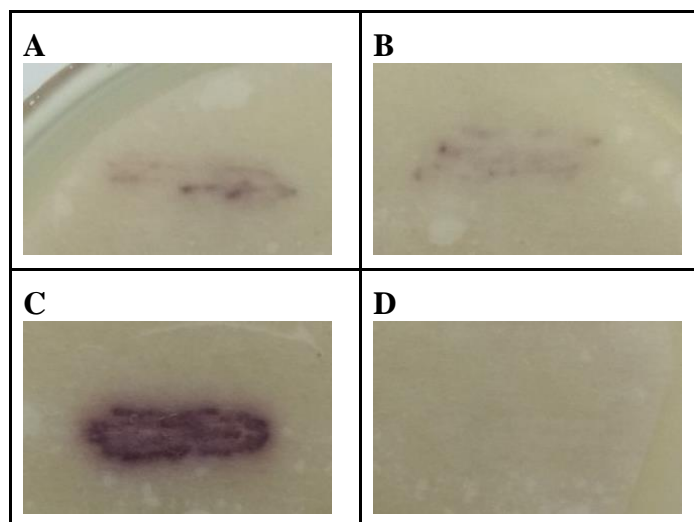


Рисунок 19. Активность кислой фосфатазы на поверхности колоний штаммов: А, В - клоны штамма GS115-pAOX1-PHO5-4-lacZ; С - GS115-pAOX1-PHO5 (положительный контроль); D - X-33 (отрицательный контроль).

Штамм GS115-pAOX1-PHO5-4-lacZ культивировали в течение 40 часов в среде ММ, содержащей метанол, с целью индукции синтеза химерного белка для количественной оценки активности КФ. Штаммы GS115-pAOX1-PHO5 и X-33 использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. Измерения проводили в 5 повторностях.

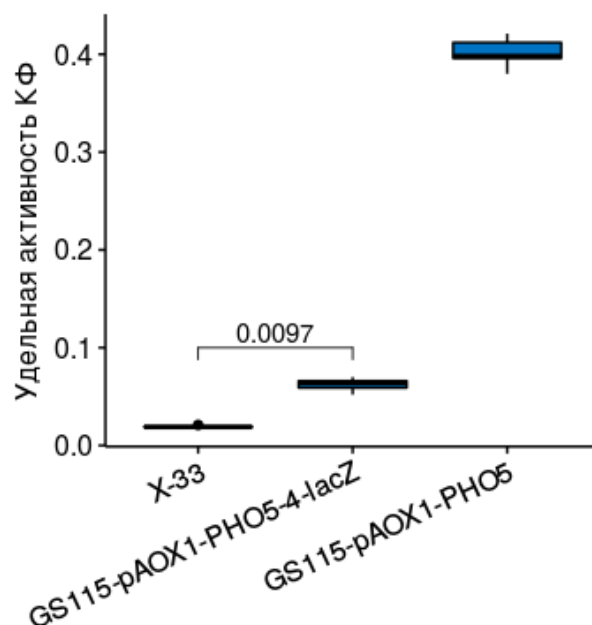


Рисунок 20. Удельная активность КФ на поверхности клеток штаммов GS115-pAOX1-PHO5-4-lacZ, X-33 и GS115-pAOX1-PHO5.

Результаты подтверждают наличие слабой активности КФ на поверхности клеток штамма GS115-pAOX1-PHO5-4-lacZ.

Также была измерена активность β -галактозидазы штаммов GS115-pAOX1-PHO5-1-lacZ и GS115-pAOX1-lacZ (рис. 21). Схема культивирования аналогична представленной выше для измерения активности КФ. Штамм GS115-pAOX1-PHO5-1-lacZ был взят для измерений, так как он содержит самую короткую последовательность *PHO5*.

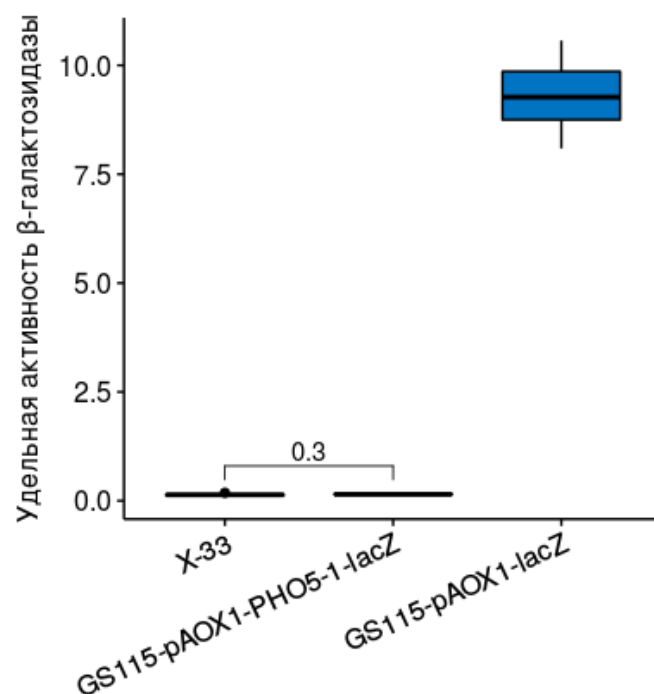


Рисунок 21. Удельная активность β-галактозидазы лизатов клеток штаммов GS115-pAOX1-PHO5-1-lacZ, GS115-pAOX1-lacZ и X-33.

По результатам измерений видно, что даже в лизатах клеток штамма, синтезирующего химерный белок с самым коротким фрагментом Pho5p (GS115-pAOX1-PHO5-1-lacZ) активность β-галактозидазы полностью отсутствует.

Возможно, что в данном случае β-галактозидаза не является подходящим репортерным белком.

Заключение

Дрожжевой дисплей широко применяется в современной биотехнологии для производства биотоплива, различных химических соединений, а также для белковой инженерии. Среди дрожжей, используемых для дрожжевого дисплея, особое внимание привлекают метилотрофные дрожжи *P. pastoris*. Они являются чрезвычайно перспективной системой синтеза гетерологичных белков. Расширение набора доступных методик и подходов для дрожжевого дисплея в дрожжах *P. pastoris* позволит еще больше повысить их значимость в биотехнологии. Ряд подходов используемых для наиболее изученного вида дрожжей *S. cerevisiae* был также применен для *P. pastoris*. В частности, использование якорных белков семейства Pir для конструирования систем иммобилизации белков на поверхности клеток.

Основываясь на уже известных данных, в нашей работе планировалось сравнить эффективность использования Pir1p из *S. cerevisiae* и *P. pastoris* в качестве якорных белков в *P. pastoris*. Однако, несмотря на то что в некоторых случаях процесс конструирования досконально повторял описанные ранее эксперименты (Wang *et al.*, 2008), выяснилось, что результаты, приведенные в этих статьях не воспроизводятся. Для штаммов GS115-ScPIR1-1, GS115-PpPIR1-1, GS115-PpPIR1-2 было показано отсутствие синтеза EGFP. Штамм GS115-ScPIR1-2 синтезировал EGFP, однако количество белка было заметно ниже по сравнению с контрольным секреторным вариантом EGFP. Эти результаты свидетельствуют о необходимости поиска новых якорных белков.

Ранее в нашей лаборатории была сконструирована репортерная система для изучения регуляции промотора гена *AOX1 P. pastoris* на основе репортерного гена *PHO5 S. cerevisiae* (Савинов и др., 2009). В данной работе используя штамм GS115-pAOX1-PHO5 мы показали, что белок Pho5 локализован преимущественно на поверхности клеток дрожжей *P. pastoris*. Эти результаты согласуются с данными, полученными для *S. cerevisiae* (Linnemans *et al.*, 1977).

Дрожжи *P. pastoris* имеют собственную репрессибельную кислую фосфатазу Pho1p. Нами было показано, что она также локализуется на поверхности клеток *P. pastoris*. Для Pho5p *S. cerevisiae* ранее были описаны границы и расположение сигнальной последовательности (Arima *et al.*, 1983). Поскольку Pho5p эффективно секретируется на поверхность клеток *P. pastoris*, мы изучили возможность применения этой сигнальной последовательности для секреции рекомбинантных белков при

синтезе в *P. pastoris*. Для этого 35 аминокислот с N-конца Pho5p были добавлены к флуоресцентному белку EGFP и было показано, что химерный белок эффективно синтезируется и секретируется в культуральную среду. Предположительно при этом сигнальная последовательность отрезается в процессе секреции белка. Таким образом мы показали, что, несмотря на значимые различия в аминокислотных последовательностях Pho1p *P. pastoris* и Pho5p *S. cerevisiae*, Pho5p активно синтезируется и секретируется в клетках *P. pastoris*. Также, оба этих белка локализуются на поверхности клетки, что говорит о сходных механизмах процессинга кислых фосфатаз у этих видов дрожжей.

Следующим этапом работы был поиск доменов кислой фосфатазы Pho5p, участвующих в ее закреплении на поверхности клетки. На первом этапе было произведено укорачивание белка Pho5 с N-конца, при этом собственная сигнальная последовательность была полностью или частично заменена на сигнальную последовательность α -фактора *S. cerevisiae*. Частичное удаление сигнальной последовательности Pho5p приводило к значимому снижению активности кислой фосфатазы, как на поверхности клеток, так и в среде. Это можно объяснить тем, что оставшийся фрагмент сигнальной последовательности Pho5p, включающий в себя сайт протеолиза, находясь рядом с сигнальным пептидом α -фактора нарушает процессинг белка. Полная замена собственной сигнальной последовательности приводила к снижению уровня активности кислой фосфатазы на поверхности клеток. При этом ее активность в среде возрастала, по сравнению с контрольным штаммом, синтезирующим Pho5p с нативной сигнальной последовательностью. Также было показано, что в случае отсутствия какой бы то ни было сигнальной последовательности кислая фосфатаза Pho5p при синтезе в *P. pastoris* не только перестает секретироваться в среду, но и полностью теряет свою активность. В литературе описано схожее поведение Pho5p без сигнальной последовательности при синтезе *S. cerevisiae* (Silve *et al.*, 1987; Monod *et al.*, 1989).

Так как дальнейшее укорочение кислой фосфатазы Pho5p с N-конца приводит к потере ее активности, дальнейший поиск якорного домена проводили за счет укорочения C-конца белка с присоединением репортерного белка β -галактозидазы. Присоединение β -галактозидазы к полноразмерному белку Pho5p приводило к значимому уменьшению активности кислой фосфатазы. Сама β -галактозидаза при этом была неактивна. Также ее активности не наблюдалось и в химерных белках с более короткими фрагментами Pho5p. В дрожжах *S. cerevisiae* β -галактозидаза часто

используется в качестве секретируемого репортера. Однако, в ряде работ было показано, что β -галактозидаза не всегда активна в составе химерного белка (Emr *et al.*, 1984). Судя по всему, в нашем случае β -галактозидаза не является подходящим репортерным белком. Исследования по поиску якорного домена Pho5p будут продолжены с использованием других вариантов репортерных систем.

Выводы

1. Неоднозначность результатов, полученных с использованием фрагментов белка Pir1 для дрожжевого дисплея в *P. pastoris* свидетельствует о необходимости поиска альтернативных якорных белков для данной системы
2. При синтезе в дрожжах *P. pastoris* кислые фосфатазы Pho5p *S. cerevisiae* и Pho1p *P. pastoris* преимущественно локализованы на поверхности клеток
3. Сигнальная последовательность Pho5p *S. cerevisiae* обеспечивает эффективную секрецию рекомбинантных белков в дрожжах *P. pastoris*

Список литературы

1. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. 1984. 142 с.
2. Падкина М., Краснопевцева Н., Петрашень М. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (сообщение I. Характеристика кислых фосфатаз разных ... // Генетика. 1974.
3. Савинов В., Румянцев А., Самбук Е. Создание тест-системы для изучения генетического контроля регуляции гена алкогольоксидазы 1 дрожжей *Pichia pastoris* // Вестник СПбГУ. 2009. Сер.3. Вып. 4. С. 114-119
4. Самсонова М.Г., Падкина М.В., Краснопевцева Н.Г. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 1975. Т. 11. № 9. С. 104–115.
5. Abe H. *et al.* Yeast cells harboring human alpha-1,3-fucosyltransferase at the cell surface engineered using Pir, a cell wall-anchored protein // FEMS Yeast Res. 2004. Т. 4. № 4-5. С. 417–425.
6. Aguilar-Uscanga B., Francois J.M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation // Lett. Appl. Microbiol. 2003. Т. 37. № 3. С. 268–274.
7. Alboukadel Kassambara (2017). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.1.6.
8. Altschul S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. 1997. Т. 25. № 17. С. 3389–3402.
9. Altschul S.F. *et al.* Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices // FEBS J. 2005. Т. 272. № 20. С. 5101–5109.

10. Andrés I. *et al.* Yeast expression of the VP8* fragment of the rotavirus spike protein and its use as immunogen in mice // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. T. 93. № 1. C. 89–98.
11. Andreu C., del Olmo M. Yeast arming by the Aga2p system: effect of growth conditions in galactose on the efficiency of the display and influence of expressing leucine-containing peptides // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. T. 97. № 20. C. 9055–9069.
12. Andreu C., del Olmo M. Potential of some yeast strains in the stereoselective synthesis of (R)-(-)-phenylacetylcarbinol and (S)-(+)-phenylacetylcarbinol and their reduced 1,2-dialcohol derivatives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. T. 98. № 13. C. 5901–5913.
13. Andreu C., del Olmo M. Development of a new yeast surface display system based on Spi1 as an anchor protein // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. T. 101. № 1. C. 287–299.
14. Andreu C., del Olmo M. Yeast arming systems: pros and cons of different protein anchors and other elements required for display // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. T. 102. № 6. C. 2543–2561.
15. Angelini A. *et al.* Protein Engineering and Selection Using Yeast Surface Display. , 2015.
16. An J. *et al.* An Alternative Approach to Synthesizing Galactooligosaccharides by Cell-Surface Display of ??-Galactosidase on *Yarrowia lipolytica* // *J. Agric. Food Chem.* 2016. T. 64. № 19. C. 3819–3827.
17. Aranda A., del Olmo M. Exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to acetaldehyde induces sulfur amino acid metabolism and polyamine transporter genes, which depend on Met4p and Haa1p transcription factors, respectively // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. T. 70. № 4. C. 1913–1922.
18. Arima K. *et al.* The nucleotide sequence of the yeast PHO5 gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a signal peptide // *Nucleic Acids Res.* 1983. T. 11. № 6. C. 1657–1672.
19. Bábíčková J. *et al.* In vivo phage display - A discovery tool in molecular biomedicine // *Biotechnol. Adv.* 2013. T. 31. № 8. C. 1247–1259.
20. Bae J. *et al.* Cellulosome complexes: natural biocatalysts as arming microcompartments

of enzymes // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2013. T. 23. № 4-5. C. 370–378.

21. Bajwa W. *et al.* Structural analysis of the two tandemly repeated acid phosphatase genes in yeast // Nucleic Acids Res. 1984. T. 12. № 20. C. 7721–7739.

22. Becker J., Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels--*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory // Curr. Opin. Biotechnol. 2012. T. 23. № 4. C. 631–640.

23. Bidlingmaier S., Su Y., Liu B. Combining Phage and Yeast Cell Surface Antibody Display to Identify Novel Cell Type-Selective Internalizing Human Monoclonal Antibodies // Methods Mol. Biol. 2015. T. 1319. C. 51–63.

24. Bielen A. *et al.* Microbial anchoring systems for cell-surface display of lipolytic enzymes // Food Technol. Biotechnol. 2014. T. 52. № 1. C. 16–34.

25. Boder E.T., Wittrup K.D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries // Nat. Biotechnol. 1997. T. 15. № 6. C. 553–557.

26. Bony M. *et al.* Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p // J. Bacteriol. 1997. T. 179. № 15. C. 4929–4936.

27. Breinig F., Schmitt M.J. Spacer-elongated cell wall fusion proteins improve cell surface expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. T. 58. № 5. C. 637–644.

28. Cappellaro C. *et al.* Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a-and alpha-agglutinin // EMBO J. 1994. T. 13. № 20. C. 4737–4744.

29. Cardona F., Del Olmo M.L., Aranda A. Phylogenetic origin and transcriptional regulation at the post-diauxic phase of SPI1, in *Saccharomyces cerevisiae* // Cell. Mol. Biol. Lett. 2012. T. 17. № 3. C. 393–407.

30. Caro L.H.P. *et al.* Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle // FEMS Microbiol. Lett. 1998. T. 161. № 2. C. 345–349.

31. Castillo L. *et al.* Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: The repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan // *Yeast*. 2003. T. 20. № 11. C. 973–983.
32. Chao G. *et al.* Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display // *Nat. Protoc.* 2006. T. 1. № 2. C. 755–768.
33. Cherf G.M., Cochran J.R. Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering // *Methods Mol. Biol.* 2015. T. 1319. C. 155–175.
34. Cregg J.M. *et al.* Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris* // *Mol. Cell. Biol.* 1989. T. 9. № 3. C. 1316–1323.
35. Cregg J.M. *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* // *Mol. Biotechnol.* 2000. T. 16. № 1. C. 23–52.
36. Cregg J.M., Vedvick T.S., Raschke W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* // *Biotechnology*. 1993. T. 11. № 8. C. 905–910.
37. Duquesne S. *et al.* Construction of a highly active xylanase displaying oleaginous yeast: comparison of anchoring systems // *PLoS One*. 2014. T. 9. № 4. C. e95128.
38. Fermiñán E., Domínguez A. The KIPHO5 gene encoding a repressible acid phosphatase in the yeast *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and transcriptional analysis of the gene, and purification and properties of the enzyme // *Microbiology*. 1997. T. 143 (Pt 8). C. 2615–2625.
39. Fu F., Wang Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review // *J. Environ. Manage.* 2011. T. 92. № 3. C. 407–418.
40. Fujita Y. *et al.* Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. T. 70. № 2. C. 1207–1212.
41. Fukuda T. *et al.* Yeast cell-surface expression of chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007. T. 71. № 11. C. 2845–2847.

42. Fukuda T. *et al.* Improvement in organophosphorus hydrolase activity of cell surface-engineered yeast strain using Flo1p anchor system // *Biotechnol. Lett.* 2010a. T. 32. № 5. C. 655–659.
43. Fukuda T. *et al.* Organophosphorus compound detection on a cell chip with yeast coexpressing hydrolase and eGFP // *Biotechnol. J.* 2010b. T. 5. № 5. C. 515–519.
44. Fushimi T. *et al.* Mutant firefly luciferases with improved specific activity and dATP discrimination constructed by yeast cell surface engineering // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. T. 97. № 9. C. 4003–4011.
45. Galán A. *et al.* Library-based display technologies: where do we stand? // *Mol. Biosyst.* 2016. T. 12. № 8. C. 2342–2358.
46. Gasch A.P. *et al.* Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes // *Mol. Biol. Cell.* 2000. T. 11. № 12. C. 4241–4257.
47. Goossens K. *et al.* The N-terminal domain of the Flo1 flocculation protein from *Saccharomyces cerevisiae* binds specifically to mannose carbohydrates // *Eukaryot. Cell.* 2011. T. 10. № 1. C. 110–117.
48. Goyal G. *et al.* Simultaneous cell growth and ethanol production from cellulose by an engineered yeast consortium displaying a functional mini-cellulosome // *Microb. Cell Fact.* 2011. T. 10. C. 89.
49. Graff C.P., Chester K., Begent R. Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 C // *Engineering Design and* 2004.
50. Groot P.W.J. de, Hellingwerf K.J., Klis F.M. Genome-wide identification of fungal GPI proteins // *Yeast.* 2003. T. 20. № 9. C. 781–796.
51. Grunden A.M. *et al.* Repression of the *Escherichia coli* modABCD (molybdate transport) operon by ModE // *J. Bacteriol.* 1996. T. 178. № 3. C. 735–744.
52. Guthrie C., Fink G.R. *Guide to yeast genetics and molecular biology.* : Academic Press, 1991.

53. Haguenaue-Tsapis R., Nagy M., Ryter A. A deletion that includes the segment coding for the signal peptidase cleavage site delays release of *Saccharomyces cerevisiae* acid phosphatase from the endoplasmic reticulum // *Mol. Cell. Biol.* 1986. T. 6. № 2. C. 723–729.
54. Halegoua S., Inouye M. Translocation and assembly of outer membrane proteins of *Escherichia coli* Selective accumulation of precursors and novel assembly intermediates caused by phenethyl alcohol // *J. Mol. Biol.* 1979. T. 130. № 1. C. 39–61.
55. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *J. Mol. Biol.* 1983. T. 166. № 4. C. 557–580.
56. Hanes S.D. *et al.* Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986. T. 83. № 6. C. 1675–1679.
57. Han L. *et al.* Redesigning of Microbial Cell Surface and Its Application to Whole-Cell Biocatalysis and Biosensors // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2018. T. 185. № 2. C. 396–418.
58. Hara K. *et al.* Membrane-displayed peptide ligand activates the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biochem.* 2012a. T. 151. № 5. C. 551–557.
59. Hara K. *et al.* Membrane-displayed somatostatin activates somatostatin receptor subtype-2 heterologously produced in *Saccharomyces cerevisiae* // *AMB Express.* 2012b. T. 2. № 1. C. 63.
60. Hartmann M., Kostrov X. Immobilization of enzymes on porous silicas--benefits and challenges // *Chem. Soc. Rev.* 2013. T. 42. № 15. C. 6277–6289.
61. Hasslacher M. *et al.* High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts // *Protein Expr. Purif.* 1997. T. 11. № 1. C. 61–71.
62. Heux S. *et al.* White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining // *Biotechnol. Adv.* 2015. T. 33. № 8. C. 1653–1670.
63. Inaba C. *et al.* Synthesis of functional dipeptide carnosine from nonprotected amino acids using carnosinase-displaying yeast cells // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. T. 86. № 6. C.

1895–1902.

64. Inan M., Meagher M.M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris* // *J. Biosci. Bioeng.* 2001. T. 92. № 6. C. 585–589.

65. Inokuma K., Hasunuma T., Kondo A. Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter // *Biotechnol. Biofuels.* 2014. T. 7. № 1. C. 8.

66. Ishida N. *et al.* Efficient production of L-Lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. T. 71. № 4. C. 1964–1970.

67. Jiang Z. *et al.* Efficient display of active lipase LipB52 with a *Pichia pastoris* cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface // *BMC Biotechnol.* 2008. T. 8. C. 4.

68. Jin Z. *et al.* Quantification analysis of yeast-displayed lipase // *Anal. Biochem.* 2014. T. 450. C. 46–48.

69. Juturu V., Wu J.C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications // *Chembiochem.* 2018. T. 19. № 1. C. 7–21.

70. Kadonosono T., Kato-Murai M., Ueda M. Alteration of substrate specificity of rat neurolysin from matrix metalloproteinase-2/9-type to -3-type specificity by comprehensive mutation // *Protein Eng. Des. Sel.* 2008. T. 21. № 8. C. 507–513.

71. Kapteyn J.C. *et al.* Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer // *Glycobiology.* 1996. T. 6. № 3. C. 337–345.

72. Kapteyn J.C., Van Den Ende H., Klis F.M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. T. 1426. № 2. C. 373–383.

73. Katahira S. *et al.* Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells //

Appl. Environ. Microbiol. 2004. T. 70. № 9. C. 5407–5414.

74. Katahira S. *et al.* Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and celooligosaccharide-assimilating yeast strain // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. T. 72. № 6. C. 1136–1143.

75. Kato M. *et al.* Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. T. 75. № 3. C. 549–555.

76. Kaya M. *et al.* Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of β -glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. T. 79. № 1. C. 51–60.

77. Khasa Y.P. *et al.* Isolation of *Pichia pastoris* PIR genes and their utilization for cell surface display and recombinant protein secretion // Yeast. 2011. T. 28. № 3. C. 213–226.

78. Kieke M.C. *et al.* Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display // Protein Eng. 1997. T. 10. № 11. C. 1303–1310.

79. Kim S.-Y. *et al.* A cell surface display system using novel GPI-anchored proteins in *Hansenula polymorpha* // Yeast. 2002. T. 19. № 13. C. 1153–1163.

80. Kim S.-Y. *et al.* In vitro evolution of lipase B from *Candida antarctica* using surface display in *Hansenula polymorpha* // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. T. 17. № 8. C. 1308–1315.

81. Klis F.M. *et al.* Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiol. Rev. 2002. T. 26. № 3. C. 239–256.

82. Kobayashi O. *et al.* Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition // J. Bacteriol. 1998. T. 180. № 24. C. 6503–6510.

83. Kotaka A. *et al.* Enhancement of beta-glucosidase activity on the cell-surface of sake yeast by disruption of SED1 // J. Biosci. Bioeng. 2010. T. 109. № 5. C. 442–446.

84. Kotrba P., Ruml T. Surface Display of Metal Fixation Motifs of Bacterial P1-Type

ATPases Specifically Promotes Biosorption of Pb²⁺ by *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. 2010. T. 76. № 8. C. 2615–2622.

85. Küberl A. *et al.* High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435 // J. Biotechnol. 2011. T. 154. № 4. C. 312–320.

86. Kuroda K. *et al.* Cell surface-engineered yeast displaying a histidine oligopeptide (hexa-His) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. T. 57. № 5-6. C. 697–701.

87. Kuroda K. *et al.* Enhancement of display efficiency in yeast display system by vector engineering and gene disruption // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. T. 82. № 4. C. 713–719.

88. Kuroda K. *et al.* Enhanced adsorption and recovery of uranyl ions by NikR mutant-displaying yeast // Biomolecules. 2014. T. 4. № 2. C. 390–401.

89. Kuroda K., Nishitani T., Ueda M. Specific adsorption of tungstate by cell surface display of the newly designed ModE mutant // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. T. 96. № 1. C. 153–159.

90. Kuroda K., Ueda M. Effective display of metallothionein tandem repeats on the bioadsorption of cadmium ion // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. T. 70. № 4. C. 458–463.

91. Kuroda K., Ueda M. Engineering of microorganisms towards recovery of rare metal ions // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. T. 87. № 1. C. 53–60.

92. Laukens B., De Visscher C., Callewaert N. Engineering yeast for producing human glycoproteins: where are we now? // Future Microbiol. 2015. T. 10. № 1. C. 21–34.

93. Liang X.-X. *et al.* Quantitative evaluation of *Candida antarctica* lipase B displayed on the cell surface of a *Pichia pastoris* based on an FS anchor system // Biotechnol. Lett. 2013. T. 35. № 3. C. 367–374.

94. Li C. *et al.* Effect of NaCl on the heavy metal tolerance and bioaccumulation of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* // Bioresour. Technol. 2013. T. 143. C. 46–52.

95. Lilly M. *et al.* Heterologous expression of a Clostridium minicellulosome in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. 2009. T. 9. № 8. C. 1236–1249.
96. Lim S. *et al.* Dual display of proteins on the yeast cell surface simplifies quantification of binding interactions and enzymatic bioconjugation reactions // Biotechnol. J. 2017. T. 12. № 5.
97. Linnemans W.A., Boer P., Elbers P.F. Localization of acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*: a clue to cell wall formation // J. Bacteriol. 1977. T. 131. № 2. C. 638–644.
98. Lin S. *et al.* A novel fragment of antigen binding (Fab) surface display platform using glycoengineered *Pichia pastoris* // J. Immunol. Methods. 2012. T. 375. № 1-2. C. 159–165.
99. Lin Y. *et al.* Display of a functional hetero-oligomeric catalytic antibody on the yeast cell surface // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. T. 62. № 2-3. C. 226–232.
100. Lin Y. *et al.* Comparison of two forms of catalytic antibody displayed on yeast-cell surface // J. Mol. Catal. B Enzym. 2004. T. 28. № 4. C. 241–246.
101. Lipke P.N., Kurjan J. Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins // Microbiol. Rev. 1992. T. 56. № 1. C. 180–194.
102. Liu X.-Y. *et al.* Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase // Metab. Eng. 2010. T. 12. № 5. C. 469–476.
103. Li W. *et al.* Cell Surface Display and Characterization of *Rhizopus oryzae* Lipase in *Pichia pastoris* Using Sed1p as an Anchor Protein // Curr. Microbiol. 2015. T. 71. № 1. C. 150–155.
104. Lu C.F., Kurjan J., Lipke P.N. A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin // Mol. Cell. Biol. 1994. T. 14. № 7. C. 4825–4833.
105. Lynd L.R. *et al.* Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. T. 16. № 5. C. 577–583.

106. Mata-Fink J. *et al.* Rapid conformational epitope mapping of anti-gp120 antibodies with a designed mutant panel displayed on yeast // J. Mol. Biol. 2013. T. 425. № 2. C. 444–456.
107. Matsui K., Kuroda K., Ueda M. Creation of a novel peptide endowing yeasts with acid tolerance using yeast cell-surface engineering // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. T. 82. № 1. C. 105–113.
108. Matsumoto T. *et al.* Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain // Appl. Environ. Microbiol. 2002. T. 68. № 9. C. 4517–4522.
109. Matsuoka H. *et al.* Cell wall structure suitable for surface display of proteins in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. 2014. T. 31. № 2. C. 67–76.
110. Meyhack B. *et al.* Two yeast acid phosphatase structural genes are the result of a tandem duplication and show different degrees of homology in their promoter and coding sequences // EMBO J. 1982. T. 1. № 6. C. 675–680.
111. Miura N., Kuroda K., Ueda M. Enzyme Evolution by Yeast Cell Surface Engineering // Methods Mol. Biol. 2015. T. 1319. C. 217–232.
112. Monod M. *et al.* Functional analysis of the signal-sequence processing site of yeast acid phosphatase // Eur. J. Biochem. 1989. T. 182. № 2. C. 213–221.
113. Mormeneo M., Pastor F.J., Zueco J. Efficient expression of a *Paenibacillus barcinonensis* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012. T. 39. № 1. C. 115–123.
114. Moura M.V.H. *et al.* Displaying Lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* Using the Yeast Surface Display Approach: Prospection of a New Anchor and Characterization of the Whole Cell Biocatalyst // PLoS One. 2015. T. 10. № 10. C. e0141454.
115. Murai T. *et al.* Construction of a starch-utilizing yeast by cell surface engineering // Appl. Environ. Microbiol. 1997. T. 63. № 4. C. 1362–1366.
116. Murai T. *et al.* Assimilation of Cellooligosaccharides by a Cell Surface-Engineered Yeast Expressing β -Glucosidase and Carboxymethylcellulase from *Aspergillus aculeatus* //

Appl. Environ. Microbiol. 1998. T. 64. № 12. C. 4857–4861.

117. Murai T. *et al.* Development of an arming yeast strain for efficient utilization of starch by co-display of sequential amylolytic enzymes on the cell surface // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. T. 51. № 1. C. 65–70.

118. Nakamura Y. *et al.* Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. T. 57. № 4. C. 500–505.

119. Nakamura Y. *et al.* Enhancement of activity of lipase-displaying yeast cells and their application to optical resolution of (R,S)-1-benzyloxy-3-chloro-2-propyl monosuccinate // Biotechnol. Prog. 2006. T. 22. № 4. C. 998–1002.

120. Nakanishi A. *et al.* Effect of pretreatment of hydrothermally processed rice straw with laccase-displaying yeast on ethanol fermentation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012a. T. 94. № 4. C. 939–948.

121. Nakanishi A. *et al.* Construction of a novel selection system for endoglucanases exhibiting carbohydrate-binding modules optimized for biomass using yeast cell-surface engineering // AMB Express. 2012b. T. 2. № 1. C. 56.

122. Nakatani Y. *et al.* Synergetic effect of yeast cell-surface expression of cellulase and expansin-like protein on direct ethanol production from cellulose // Microb. Cell Fact. 2013. T. 12. C. 66.

123. Nishitani T. *et al.* Molecular design of yeast cell surface for adsorption and recovery of molybdenum, one of rare metals // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. T. 86. № 2. C. 641–648.

124. Omidfar K., Daneshpour M. Advances in phage display technology for drug discovery // Expert Opin. Drug Discov. 2015. T. 10. № 6. C. 651–669.

125. Orlean P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall // Genetics. 2012. T. 192. № 3. C. 775–818.

126. Oshima Y. Regulatory circuits for gene expression: The metabolism of galactose and

phosphatase // The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression. 1982. C. 159–180.

127. Ou J., Cao Y. Incorporation of *Nasutitermes takasagoensis* endoglucanase into cell surface-displayed minicellulosomes in *Pichia pastoris* X33 // J. Microbiol. Biotechnol. 2014. T. 24. № 9. C. 1178–1188.

128. Payne W.E., Gannon P.M., Kaiser C.A. An inducible acid phosphatase from the yeast *Pichia pastoris*: characterization of the gene and its product // Gene. 1995. T. 163. № 1. C. 19–26.

129. Perlman D., Halvorson H.O. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides // J. Mol. Biol. 1983. T. 167. № 2. C. 391–409.

130. Puig S., Pérez-Ortín J.E. Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift // Yeast. 2000. T. 16. № 2. C. 139–148.

131. R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

132. Razai A. *et al.* Molecular evolution of antibody affinity for sensitive detection of botulinum neurotoxin type A // J. Mol. Biol. 2005. T. 351. № 1. C. 158–169.

133. Satomura A., Kuroda K., Ueda M. Environmental Stress Tolerance Engineering by Modification of Cell Surface and Transcription Factor in *Saccharomyces cerevisiae* // Current Environmental Engineering. 2014. T. 1. № 3. C. 149–156.

134. Sato N. *et al.* Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. T. 60. № 4. C. 469–474.

135. Schreuder M.P. *et al.* Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. 1993. T. 9. № 4. C. 399–409.

136. Sheehan J., Marasco W.A. Phage and Yeast Display // Microbiol Spectr. 2015. T. 3. № 1. C. AID-0028–2014.

137. Shibasaki S. *et al.* Creation of cell surface-engineered yeast that display different

fluorescent proteins in response to the glucose concentration // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001a. T. 57. № 4. C. 528–533.

138. Shibasaki S. *et al.* Intelligent yeast strains with the ability to self-monitor the concentrations of intra- and extracellular phosphate or ammonium ion by emission of fluorescence from the cell surface // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001b. T. 57. № 5-6. C. 702–707.

139. Shibasaki S., Maeda H., Ueda M. Molecular display technology using yeast--arming technology // *Anal. Sci.* 2009. T. 25. № 1. C. 41–49.

140. Shigechi H. *et al.* Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of a Novel Surface-Engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and α -Amylase // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. T. 70. № 8. C. 5037–5040.

141. Shimma Y.-I. *et al.* Construction of a library of human glycosyltransferases immobilized in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. T. 72. № 11. C. 7003–7012.

142. Shimoi H. *et al.* Sed1p Is a Major Cell Wall Protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the Stationary Phase and Is Involved in Lytic Enzyme Resistance // *J. Bacteriol.* 1998. T. 180. № 13. C. 3381–3387.

143. Shiraga S. *et al.* Enhanced reactivity of *Rhizopus oryzae* lipase displayed on yeast cell surfaces in organic solvents: potential as a whole-cell biocatalyst in organic solvents // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005a. T. 71. № 8. C. 4335–4338.

144. Shiraga S. *et al.* Creation of *Rhizopus oryzae* lipase having a unique oxyanion hole by combinatorial mutagenesis in the lid domain // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005b. T. 68. № 6. C. 779–785.

145. Silve S. *et al.* The yeast acid phosphatase can enter the secretory pathway without its N-terminal signal sequence // *Mol. Cell. Biol.* 1987. T. 7. № 9. C. 3306–3314.

146. Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // *Science.* 1985. T. 228. № 4705. C. 1315–1317.

147. Su G.-D. *et al.* Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. T. 86. № 5. C. 1493–1501.
148. Sumita T. *et al.* Comparison of Cell Wall Localization among Pir Family Proteins and Functional Dissection of the Region Required for Cell Wall Binding and Bud Scar Recruitment of Pir1p // *Eukaryot. Cell.* 2005. T. 4. № 11. C. 1872–1881.
149. Sun Y.-F. *et al.* Double *Candida antarctica* lipase B co-display on *Pichia pastoris* cell surface based on a self-processing foot-and-mouth disease virus 2A peptide // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. T. 96. № 6. C. 1539–1550.
150. Takayama K. *et al.* Surface display of organophosphorus hydrolase on *Saccharomyces cerevisiae* // *Biotechnol. Prog.* 2006. T. 22. № 4. C. 939–943.
151. Takayama K. *et al.* Estimation of enzyme kinetic parameters of cell surface-displayed organophosphorus hydrolase and construction of a biosensing system for organophosphorus compounds // *Anal. Sci.* 2011. T. 27. № 8. C. 823–826.
152. Tanaka T. *et al.* Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. T. 95. № 3. C. 577–591.
153. Tang S. *et al.* A Living Eukaryotic Autocementation Kit from Surface Display of Silica Binding Peptides on *Yarrowia lipolytica* // *ACS Synth. Biol.* 2016. T. 5. № 12. C. 1466–1474.
154. Toh-e A. *et al.* Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock // *Yeast.* 1993. T. 9. № 5. C. 481–494.
155. Toh-e A., Kobayashi S., Oshima Y. Disturbance of the machinery for the gene expression by acidic pH in the repressible acid phosphatase system of *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Gen. Genet.* 1978. T. 162. № 2. C. 139–149.
156. Tokuhiko K. *et al.* Lactic fermentation of cellobiose by a yeast strain displaying β -glucosidase on the cell surface // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. T. 79. № 3. C. 481.

157. Tsai S.-L. *et al.* Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. T. 75. № 19. C. 6087–6093.
158. Tschopp J.F. *et al.* Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris* // *Nucleic Acids Res.* 1987. T. 15. № 9. C. 3859–3876.
159. Ueda M. Establishment of cell surface engineering and its development // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016. T. 80. № 7. C. 1243–1253.
160. Van der Vaart J.M. *et al.* Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Bacteriol.* 1995. T. 177. № 11. C. 3104–3110.
161. Van der Vaart J.M. *et al.* Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. T. 63. № 2. C. 615–620.
162. Wang Q. *et al.* Construction of a novel *Pichia pastoris* cell-surface display system based on the cell wall protein Pir1 // *Curr. Microbiol.* 2008. T. 56. № 4. C. 352–357.
163. Wang Z. *et al.* A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities // *Protein Eng. Des. Sel.* 2005. T. 18. № 7. C. 337–343.
164. Wang Z. *et al.* Improvement of a recombinant anti-monkey anti-CD3 diphtheria toxin based immunotoxin by yeast display affinity maturation of the scFv // *Bioconjug. Chem.* 2007. T. 18. № 3. C. 947–955.
165. Washida M. *et al.* Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. T. 56. № 5-6. C. 681–686.
166. Wasilenko J.L. *et al.* Cell surface display of highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin on the surface of *Pichia pastoris* cells using alpha-agglutinin for production of oral vaccines // *Biotechnol. Prog.* 2010. T. 26. № 2. C. 542–547.
167. Waterham H.R. *et al.* Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter // *Gene.* 1997. T. 186. № 1. C. 37–44.

168. Wegner E.H. Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities // US Patent. 1986.
169. Wentz A.E., Shusta E.V. A novel high-throughput screen reveals yeast genes that increase secretion of heterologous proteins // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. T. 73. № 4. C. 1189–1198.
170. Wildt S., Gerngross T.U. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. T. 3. № 2. C. 119–128.
171. Wu S., Letchworth G.J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol // *Biotechniques*. 2004. T. 36. № 1. C. 152–154.
172. Yanase S. *et al.* Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. T. 88. № 1. C. 381–388.
173. Yang N. *et al.* The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. T. 98. № 7. C. 2897–2905.
174. Yasui M. *et al.* An arming yeast with the ability to entrap fluorescent 17 β -estradiol on the cell surface // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. T. 59. № 2. C. 329–331.
175. Yin Q.Y. *et al.* Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages // *J. Biol. Chem.* 2005. T. 280. № 21. C. 20894–20901.
176. Yue L. *et al.* Construction of a new plasmid for surface display on cells of *Yarrowia lipolytica* // *J. Microbiol. Methods*. 2008. T. 72. № 2. C. 116–123.
177. Yuzbasheva E.Y. *et al.* Efficient cell surface display of Lip2 lipase using C-domains of glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. T. 91. № 3. C. 645–654.
178. Yuzbasheva E.Y. *et al.* Cell surface display of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2p using

the cell wall protein YIPir1p, its characterization, and application as a whole-cell biocatalyst // Appl. Biochem. Biotechnol. 2015. T. 175. № 8. C. 3888–3900.

179. Zhang L. *et al.* Screening for glycosylphosphatidylinositol-modified cell wall proteins in *Pichia pastoris* and their recombinant expression on the cell surface // Appl. Environ. Microbiol. 2013. T. 79. № 18. C. 5519–5526.

180. Zhao H. *et al.* Interaction of alpha-agglutinin and a-agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* sexual cell adhesion molecules // J. Bacteriol. 2001. T. 183. № 9. C. 2874–2880.

Благодарности

Я хотел бы поблагодарить Самбук Елену Викторовну за руководство и постановку задач, Румянцева Андрея Михайловича за постоянную помощь в освоении методик, планировании экспериментов и поддержку на протяжении всего времени работы в лаборатории. Падкину Марину Владимировну за ценные рекомендации и предоставленную возможность проведения работы. Сотрудников ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий», за помощь в проведении экспериментов.

Хочется поблагодарить весь коллектив кафедры генетики и биотехнологии, а в особенности сотрудников лаборатории биохимической генетики за дружескую атмосферу и поддержку.